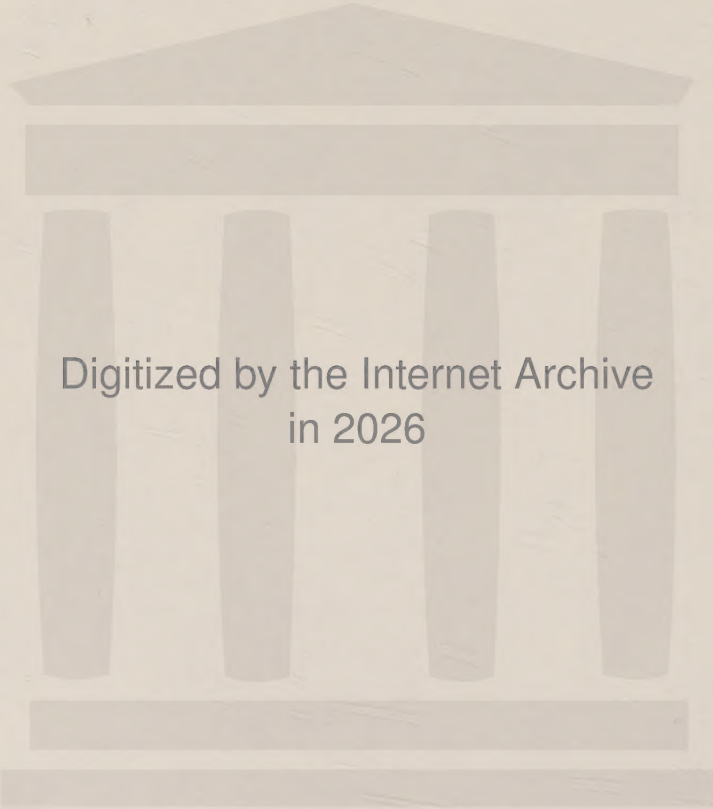


**MONONUKLEÄRE ZELLEN IN TRANSPLANTAT
UND PERIPHEREM BLUT BEI PATIENTEN
NACH ALLOGENER NIERENTRANSPLANTATION**

- Eine vergleichende Studie -

MARTIN WELTE

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0088

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Universität
München, Klinikum Großhadern

Vorstand: Prof Dr. Dr. h.c. W. Brendel

MONONUKLEÄRE ZELLEN IN TRANSPLANTAT UND PERIPHEREM BLUT BEI
PATIENTEN NACH ALLOGENER NIERENTRANSPLANTATION
-Eine vergleichende Studie-

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martin Welte

aus

Würzburg

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Hammer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Brendel
Prof. Dr. Heberer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1986

Meinen Eltern

INHALT

INHALT DER ARBEIT

1.1	Der Verfasser	1
1.2	Der Verfasser der Arbeit	2
1.3	Der Verfasser der Arbeit	3
1.4	Der Verfasser der Arbeit	4
1.5	Der Verfasser der Arbeit	5
1.6	Der Verfasser der Arbeit	6
1.7	Der Verfasser der Arbeit	7
1.8	Der Verfasser der Arbeit	8
1.9	Der Verfasser der Arbeit	9
1.10	Der Verfasser der Arbeit	10
1.11	Der Verfasser der Arbeit	11
1.12	Der Verfasser der Arbeit	12
1.13	Der Verfasser der Arbeit	13
1.14	Der Verfasser der Arbeit	14
1.15	Der Verfasser der Arbeit	15
1.16	Der Verfasser der Arbeit	16
1.17	Der Verfasser der Arbeit	17
1.18	Der Verfasser der Arbeit	18
1.19	Der Verfasser der Arbeit	19
1.20	Der Verfasser der Arbeit	20
1.21	Der Verfasser der Arbeit	21
1.22	Der Verfasser der Arbeit	22
1.23	Der Verfasser der Arbeit	23
1.24	Der Verfasser der Arbeit	24
1.25	Der Verfasser der Arbeit	25
1.26	Der Verfasser der Arbeit	26
1.27	Der Verfasser der Arbeit	27
1.28	Der Verfasser der Arbeit	28
1.29	Der Verfasser der Arbeit	29
1.30	Der Verfasser der Arbeit	30
1.31	Der Verfasser der Arbeit	31
1.32	Der Verfasser der Arbeit	32
1.33	Der Verfasser der Arbeit	33
1.34	Der Verfasser der Arbeit	34
1.35	Der Verfasser der Arbeit	35
1.36	Der Verfasser der Arbeit	36
1.37	Der Verfasser der Arbeit	37
1.38	Der Verfasser der Arbeit	38
1.39	Der Verfasser der Arbeit	39
1.40	Der Verfasser der Arbeit	40
1.41	Der Verfasser der Arbeit	41
1.42	Der Verfasser der Arbeit	42
1.43	Der Verfasser der Arbeit	43
1.44	Der Verfasser der Arbeit	44
1.45	Der Verfasser der Arbeit	45
1.46	Der Verfasser der Arbeit	46
1.47	Der Verfasser der Arbeit	47
1.48	Der Verfasser der Arbeit	48
1.49	Der Verfasser der Arbeit	49
1.50	Der Verfasser der Arbeit	50
1.51	Der Verfasser der Arbeit	51
1.52	Der Verfasser der Arbeit	52
1.53	Der Verfasser der Arbeit	53
1.54	Der Verfasser der Arbeit	54
1.55	Der Verfasser der Arbeit	55
1.56	Der Verfasser der Arbeit	56
1.57	Der Verfasser der Arbeit	57
1.58	Der Verfasser der Arbeit	58
1.59	Der Verfasser der Arbeit	59
1.60	Der Verfasser der Arbeit	60
1.61	Der Verfasser der Arbeit	61
1.62	Der Verfasser der Arbeit	62
1.63	Der Verfasser der Arbeit	63
1.64	Der Verfasser der Arbeit	64
1.65	Der Verfasser der Arbeit	65
1.66	Der Verfasser der Arbeit	66
1.67	Der Verfasser der Arbeit	67
1.68	Der Verfasser der Arbeit	68
1.69	Der Verfasser der Arbeit	69
1.70	Der Verfasser der Arbeit	70
1.71	Der Verfasser der Arbeit	71
1.72	Der Verfasser der Arbeit	72
1.73	Der Verfasser der Arbeit	73
1.74	Der Verfasser der Arbeit	74
1.75	Der Verfasser der Arbeit	75
1.76	Der Verfasser der Arbeit	76
1.77	Der Verfasser der Arbeit	77
1.78	Der Verfasser der Arbeit	78
1.79	Der Verfasser der Arbeit	79
1.80	Der Verfasser der Arbeit	80
1.81	Der Verfasser der Arbeit	81
1.82	Der Verfasser der Arbeit	82
1.83	Der Verfasser der Arbeit	83
1.84	Der Verfasser der Arbeit	84
1.85	Der Verfasser der Arbeit	85
1.86	Der Verfasser der Arbeit	86
1.87	Der Verfasser der Arbeit	87
1.88	Der Verfasser der Arbeit	88
1.89	Der Verfasser der Arbeit	89
1.90	Der Verfasser der Arbeit	90
1.91	Der Verfasser der Arbeit	91
1.92	Der Verfasser der Arbeit	92
1.93	Der Verfasser der Arbeit	93
1.94	Der Verfasser der Arbeit	94
1.95	Der Verfasser der Arbeit	95
1.96	Der Verfasser der Arbeit	96
1.97	Der Verfasser der Arbeit	97
1.98	Der Verfasser der Arbeit	98
1.99	Der Verfasser der Arbeit	99
2.00	Der Verfasser der Arbeit	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. MATERIAL UND METHODE</u>	
2.1 Patientengut	4
2.1.1 Kriterien der Patientenauswahl	4
2.1.2 Anzahl, Alters- und Geschlechtsverteilung	4
2.1.3 Grunderkrankungen	5
2.1.4 Empfänger- Spender-Auswahl	5
2.1.5 Art der Transplantation	6
2.1.6 Postoperative Überwachung	7
2.1.6.1 Diagnostik bei Abstoßungsreaktion	7
2.1.6.2 Diagnostik bei Virusinfektion	8
2.1.7 Immunsuppressive Therapie	9
2.1.7.1 Basistherapie	9
2.1.7.2 Basistherapie bei Risikopatienten	10
2.1.7.3 Abstoßungstherapie	11
2.1.7.4 Therapie bei Virusinfektionen	11
2.2 Zellgewinnung aus dem peripheren Blut	12
2.2.1 Differentialblutbild und Leukozytenzahl	12
2.2.2 Isolierung des mononukleären Konzentrats	12
2.2.3 Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate	13
2.2.4 Färbung nach Pappenheim	14
2.2.5 Mikroskopische Differenzierung	14
2.2.5.1 Zelldifferenzierung des mononukleären Kon- zentrats	15
2.2.6 Errechnung der Absolutzahlen für Lympho- zyten und Lymphozytensubpopulationen	16
2.2.7 Zellmarkierung mit monoklonalen Antikörpern	17
2.2.7.1 Methode der indirekten Immunfluoreszenz	17
2.2.7.2 Verwendete monoklonale Antikörper	18
2.2.7.3 Immunfluoreszenzmikroskopie	18
2.3 Zellgewinnung aus der Transplantatniere	19
2.3.1 Feinnadelaspirationsbiopsie	19
2.3.2 Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate	20
2.3.3 Mikroskopische Differenzierung des Feinna- delaspirates	20

2.3.4	Erstellung des "Corrected Increment"	20
2.4	Statistische Auswertung	21

3. ERGEBNISSE

3.1	Mononukleäre Zellen in Transplantat und peripherem Blut bei zellulärer Transplantatreaktion	22
3.1.1	Anzahl und Verteilung der FNB	22
3.1.2	Anzahl und Verteilung der mononukleären Konzentrate	24
3.1.3	Mononukleäre Zellen im Transplantat	24
3.1.3.1	Increment mononukleärer Zellen im Transplantat	25
3.1.3.2	Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl	25
3.1.4	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut	29
3.1.4.1	Absolutzahlen der Lymphozytensubpopulationen	29
3.1.4.2	Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl	32
3.1.5	Mononukleäre Zellen in Transplantaten mit und ohne Blastzellen	32
3.1.5.1	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut von Transplantaten mit und ohne Blastzellen	34
3.2	Mononukleäre Zellen in Transplantat und peripherem Blut bei schwerer zellulärer Transplantatreaktion (ZTR III) und Virusinfektion	37
3.2.1	Anzahl und Verteilung der FNB	37
3.2.2	Anzahl und Verteilung der mononukleären Konzentrate	37
3.2.3	Mononukleäre Zellen im Transplantat	38
3.2.3.1	Increment mononukleärer Zellen im Transplantat	41
3.2.3.2	Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl	41
3.2.4	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut	43
3.2.4.1	Absolutzahlen mononukleärer Zellen	43
3.2.4.2	Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl	43

3.3	Markierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mit monoklonalen Antikörpern	47
3.3.1	T-Zellsubpopulationen bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion	47
3.3.2	Aktivierte Lymphozyten (OKT 10 ⁺ Zellen) bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfekt	49
3.3.3	B-Lymphozyten (MOAK 5202 ⁺ Zellen) bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfekt	49
3.3.4	DR-Antigen präsentierende Zellen bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion	52
3.4	Fallbeschreibung des Patienten K.H.	52

4. DISKUSSION

4.1	Diskussion der Methode	59
4.1.1	Feinnadelbiopsie	59
4.1.2	Mononukleäres Konzentrat	60
4.2	Diskussion der Ergebnisse bei zellulärer Transplantatreaktion	61
4.2.1	Mononukleäre Zellen im Transplantat	63
4.2.2	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut	66
4.2.3	Vergleich der FNB und des mononukleären Konzentrates von Transplantaten mit und ohne Blastzellen	68
4.3	Diskussion der Ergebnisse bei Virusinfektion und schwerer zellulärer Transplantatreaktion	69
4.3.1	Vergleich mononukleärer Zellen im Transplantat	70
4.3.2	Vergleich mononukleärer Zellen im peripheren Blut	71
4.4	Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion	73
4.5	Diskussion der Fallbeschreibung	76

5. ZUSAMMENFASSUNG

78

6. LITERATURVERZEICHNIS

80

7. ANHANG

Verwendete Abkürzungen

ALG	= Antilymphozytenglobulin
ALy	= Aktivierter Lymphozyt
AR	= Abstoßungsreaktion
ATG	= Antithymozytenglobulin
ATN	= Akute Tubulusnekrose
AZA	= Azathioprin
CI	= Corrected Increment
CMV	= Zytomegalievirus
CSA	= Ciclosporin A
EBV	= Epstein-Barr-Virus
EZ	= Endothelzelle
FNA	= Feinnadelaspirat
FNAC	= Feinnadelaspirationszytologie
FNB	= Feinnadelbiopsie
HSV	= Herpes Simplex Virus
HZV	= Herzzeitvolumen
KBR	= Komplementbindungsreaktion
LB	= Lymphoblast
LGL	= Large Granular Lymphocyte
LY	= Lymphozyt
LYSP	= Lymphozytensubpopulation
McAb	= Monoklonaler Antikörper
MNK	= Mononukleäres Konzentrat
MNZ	= Mononukleäre Zellen
Mono	= Monozyt
MP	= Methylprednisolon
NGZ	= Nierengewebszelle
p.B.	= peripheres Blut
po	= postoperativ
T _h -LY	= T-Helfer-Lymphozyt
T _{s/k} -LY	= T-Suppressor/Killer-Lymphozyt
TZ	= Tubuluszelle
VI	= Virusinfektion
VZV	= Varizella-Zoster-Virus

1. EINLEITUNG

Die Nierentransplantation ist in den letzten Jahren eine anerkannte Routinemethode zur Therapie der terminalen Niereninsuffizienz geworden. Allein am Klinikum Großhadern konnten 1985 über 150 Nierentransplantationen durchgeführt werden.

Der Erfolg einer Nierentransplantation hängt heute nicht mehr von der Lösung operationstechnischer Schwierigkeiten ab - diese gelten als gelöst -, sondern von der Beherrschung der immunologischen Vorgänge, die zur Transplantatabstoßung führen.

Ein entscheidender Schritt zu einer effektiveren immunsuppressiven Therapie war die Einführung von CSA in den klinischen Gebrauch durch R. CALNE 1978 (19). Seither wurde in mehreren Studien über Einjahres-Transplantatüberlebensraten zwischen 85 und 95 % berichtet und auch nach zwei Jahren funktionieren noch über 80 % der Transplantate (20, 36, 93, 102, 138, 142). Trotz der verbesserten Immunsuppression sind akute Abstoßungsreaktionen für 2/3 der Transplantatverluste innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation verantwortlich (87, 102). Dies macht deutlich, warum die schnelle, zuverlässige Diagnose und die Aufklärung der immunologischen Mechanismen, die zur Abstoßung führen, von so großer Bedeutung ist.

Eine schwerwiegende Nebenwirkung der immunsuppressiven Therapie ist die erhöhte Gefährdung der Patienten durch virale und bakterielle Infektionen (15, 44, 101). Große Bedeutung kommt dabei Infektionen mit Viren der Herpesgruppe zu, besonders der CMV-Infektion (4). Unter CSA-Immunsuppression wurde zwar eine geringere Inzidenz von CMV-Infektionen beobachtet, dennoch bleibt diese Infektion die häufigste und wegen ihrer Prädisposition zu opportunistischen Superinfektionen gefährlichste virale Erkrankung nach Nierentransplantation (44, 81, 115, 140, 144).

Eine mit CMV-Virämie assoziierte Glomerulopathie kann zum Funktionsverlust des Transplantates führen und ist klinisch somit kaum von der akuten Abstoßungsreaktion zu unterscheiden (134). Die Differentialdiagnose zwischen diesen beiden Komplikationen ist aber von äußerster Wichtigkeit: Im Fall einer Abstoßung muß die immunsuppressive Therapie intensiviert werden. Handelt es sich um eine CMV-Infektion, muß die Immunsuppression reduziert oder ganz abgesetzt werden.

Bei V.a. eine Abstoßungsreaktion wird die Diagnose durch eine Stanzbiopsie histologisch oder mit der Feinnadelbiopsie zytologisch gesichert. Feinnadelbiopsie-Ergebnisse korrelieren gut mit denen der Stanzbiopsie. Die Methode ist komplikationsärmer und die Ergebnisse stehen in wenigen Stunden zur Verfügung (8, 29, 52, 78, 79, 109).

Die Diagnose von Virusinfektionen wird durch signifikante Titeranstiege spezifischer Antikörper gegen das jeweilige Virus gesichert (39, 150). Da die Latenzzeit bis signifikante Titeranstiege auftreten für therapeutische Konsequenzen oft zu lang ist, wäre eine einfache und schnelle Screeningmethode wünschenswert.

Bei Patienten nach Herztransplantation wurden im Blut vor Abstoßungsreaktionen Veränderungen in der Zusammensetzung der mononukleären Zellen beobachtet. Blastzellen traten im mononukleären Konzentrat auf, noch bevor eine Abstoßung klinisch oder in der Endomyokardbiopsie diagnostiziert werden konnte (123, 124).

Ziel dieser Studie war, gleichzeitig die mononukleäre Inflammation im Transplantat, die mit der Feinnadelbiopsie erfaßt wurde, und die Zusammensetzung der mononukleären Zellen im Blut, die mikroskopisch und mit monoklonalen Antikörpern differenziert wurden, zu untersuchen. Das besondere Interesse galt der Frage, ob es bei unterschiedlich schwerer zellulärer Transplantatreaktion Veränderungen der mononukleären Zellen im Blut gibt und ob diese eventuell diagnostisch nutzbar sind. Weiterhin sollte wegen der besonderen differentialdiagnostischen Bedeutung

geprüft werden, wie sich die zelluläre Zusammensetzung der Inflammation in Transplantat und Blut bei Virusinfektionen und zellulärer Transplantatreaktion unterscheidet.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Patientengut

2.1.1 Kriterien der Patientenauswahl

In dieser Studie wurden von April 1983 bis Dezember 1983 Patienten des Transplantationszentrums München untersucht, bei denen eine allogene Nierentransplantation durchgeführt worden ist.

In die Studie aufgenommen wurde:

- Jeder zweite Patient nach Nierentransplantation für die Dauer des stationären Aufenthaltes.
- Jeder Patient bei dem eine Stanzbiopsie durchgeführt wurde.
- Patienten mit Verdacht auf eine schwere Virusinfektion.

2.1.2 Anzahl, Alters- und Geschlechtsverteilung

Insgesamt wurden 67 Patienten untersucht: Darunter waren 21 Frauen und 46 Männer. 59 Patienten wurden 1983, 7 Patienten 1982 und ein Patient 1981 transplantiert. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Transplantation betrug 38,3 Jahre. Der jüngste Patient war 15 Jahre, der älteste 61 Jahre alt. 19,9 % der Patienten gehörten in die Altersgruppe über 50 Jahre, die bisher als Risikogruppe galt. 3 % waren jünger als 20 Jahre. Die genaue Altersverteilung gibt Tabelle 1 wieder.

Tabelle 1: Altersverteilung

Alter (Jahre)	Anzahl (n)	%
10 - 19	2	3
20 - 29	14	20,9
30 - 39	23	34,3
40 - 49	16	23,9
50 - 59	11	16,4
60 - 69	1	1,5

2.1.3 Grunderkrankungen

Die Ursache der terminalen Niereninsuffizienz konnte meist histologisch oder anamnestisch gesichert werden. Tabelle 2 zeigt die Häufigkeit der verschiedenen Grunderkrankungen.

Am häufigsten - 40 von 67 Patienten - führte eine chronische Glomerulonephritis unterschiedlicher Genese zum terminalen Nierenversagen. In 8 Fällen war eine chronische bakterielle Pyelonephritis die Ursache. In die Gruppe "Interstitielle nephritis" fielen 2 medikamentös induzierte Nephritiden und eine Nephritis unbekannter Genese. Zystennieren wurden in 3 Fällen, urogenitale Anomalien in 4 Fällen als Ursache der Niereninsuffizienz diagnostiziert. Bei den 5 "anderen" Ursachen handelte es sich um eine Urogenital-Tuberkulose, eine Schwangerschaftsgestose, eine primäre Amyloidose, eine maligne Nephrosklerose und einen Typ-I-Diabetes. Bei 5 Patienten konnte die Ursache des terminalen Nierenversagens nicht eindeutig geklärt werden.

Tabelle 2: Ursache der terminalen Niereninsuffizienz

Grunderkrankung	Anzahl (n)	%
Chronische Glomerulonephritis	40	59,9
Chronische Pyelonephritis	8	11,9
Interstitielle Nephritis	3	4,5
Zystennieren	3	4,5
Urogenitale Anomalien	4	6
Andere Ursachen	5	7,5
Unbekannte Ursachen	4	6

2.1.4 Empfänger- Spender-Auswahl

Zwischen Spender und Empfänger waren ABO-Blutgruppengleichheit und ein negatives "Cross-match" (Kreuzprobe nach Terasaki) obligat (2, 37, 99). Die HLA, -B, -C und DR-

Antigene von Empfänger und Spender, sowie die Anzahl der nichtidentischen Antigene ("mismatches") wurden bestimmt (3, 159). Tabelle 3 zeigt die Verteilung dieser "mismatches". Jedes Empfängerserum wurde vor Transplantation auf präformierte Antikörper untersucht (59). 17 Patienten hatten präformierte Antikörper gegen im Mittel 42,8 % der Panel-Zellen. Diese Patienten wurden in die Risikogruppe eingestuft. Vor Transplantation wurden jedem Patienten mindestens 3 gewaschene Erythrozytenkonzentrate oder Vollblutkonserven transfundiert (86, 108).

Tabelle 3: Nicht-HLA-identische Spender- und Empfängerantigene ("mismatches")

HLA, -B, -C mismatches	n	DR-mismatches	n
0	1	0	23
1	7	1	32
2	24	2	12
3	19		
4	16		

2.1.5 Art der Transplantation

Es wurden 51 Erst-, 15 Zweit- und eine Drittransplantation durchgeführt. Zwei Patienten wurden bei Erst- und Zweittransplantation in der Studie untersucht. Daraus ergab sich, daß von 67 Patienten 69 Transplantate beobachtet wurden. Einem Patienten wurden Niere und Pankreas simultan transplantiert. 68 Kadavernieren und eine Lebendspender-niere wurden verpflanzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl und Verteilung der Transplantationen

Ersttransplantation	49	Patienten
Zweittransplantation	13	Patienten
Erst- und Zweittransplantation	2	Patienten
Drittransplantation	1	Patient

2.1.6 Postoperative Überwachung

Im Rahmen der postoperativen Überwachung müssen folgende Komplikationen sicher erkannt und differenzialdiagnostisch voneinander getrennt werden:

1. Die akute Abstoßungsreaktion
2. Die akute Tubulusnekrose als Organkonservierungsschaden
3. Die Virusinfektion mit Viren der Herpesgruppe
4. Die CSA-Nephrotoxizität

2.1.6.1 Diagnostik der Abstoßungsreaktion

AR lassen sich nur durch eine Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden diagnostizieren (66, 82). Das gilt besonders seit Einführung von CSA zur Immunsuppression. Folgende Abbildung zeigt einen Versuch, die verschiedenen Methoden in ihrer Bedeutung für die Klinik zu werten.

KLINIK
LABOR
HISTOLOGIE
SONOGRAPHIE
ASPIRATIONSZYTOLOGIE
NUKLEARMEDIZIN



Bestand klinisch oder laborchemisch der Verdacht auf eine AR, wurde deswegen eine Stanzbiopsie zur Gewinnung der Histologie durchgeführt und gleichzeitig eine FNB entnommen.

2.1.6.2 Diagnostik bei Viruserkrankungen

Vor Transplantationen wurden alle Patienten routinemäßig auf Virusinfektionen der Herpesgruppe untersucht. Diese Basisserologie bestand aus folgenden Untersuchungen (39, 150):

1. KBR gegen HSV
2. KBR gegen HZV
3. KBR und radioimmunologische Bestimmung von IgM Antikörpern gegen CMV
4. Bestimmung von IgG Antikörpern gegen EBV Capsid Antigen (EBV-CA IgG), Bestimmung von IgM Antikörpern gegen EBV

Nicht regelmäßig wurden die Werte für EBV "early antigen" und EBV "nuclear antigen" bestimmt. Bestand der Verdacht auf eine Virusinfektion, wurden diese serologischen Untersuchungen wiederholt. Alle diese Bestimmungen wurden im Institut für Mikrobiologie der Universität München durchgeführt. Als Grundlage zur Einteilung der Patienten in die Gruppe mit Virusinfektionen dienten die Angaben auf den Befundbögen dieses Institutes.

Als signifikante Veränderungen wurden gewertet (90, 110):

- CMV IgM-Titer $> 1:160$
- CMV IgM-Titer $> 1:40$ und KBR-Titeranstieg um das 4fache innerhalb von 2 Wochen
- EBV IgM-Titer $> 1:32$ und Anstieg des IgG-Titers um das 4fache.

Die klinischen Verläufe der Patienten wurden auf Symptome einer Virusinfektion untersucht. Dabei wurde besonders auf Fieber, Transaminasenanstiege, Verschlechterung der Transplantatfunktion, dermatologische Symptome und Zeichen einer interstitiellen Pneumonie geachtet (97, 148). Zwölf von 67 Patienten erfüllten die o.g. Kriterien einer Virusinfektion (17,9%).

2.1.7 Immunsuppressive Therapie

Jeder Patient wird nach Nierentransplantation zur Unterdrückung einer AR immunsupprimiert.

Bei den Patienten dieser Studie wurde als Basisimmunsuppression CSA¹⁾ in Kombination mit "low dose" MP²⁾ gegeben. AR wurden mit einer Bolustherapie MP behandelt. Konnten die AR damit nicht beherrscht werden, wurde ALG³⁾ bzw. ATG⁴⁾ verwendet. Risikopatienten erhielten unmittelbar nach Transplantation eine Dreifachtherapie bestehend aus CSA, AZA⁵⁾ und MP (Triple Drug Schema). Die Dauertherapie bestand auch in dieser Gruppe aus einer Kombination von CSA und MP.

2.1.7.1 Basistherapieschema

CSA ist ein aus 12 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (11, 12, 13, 84). Seit 1978 wird es klinisch zur Immunsuppression eingesetzt (19). Bei Patienten dieser Studie wurde es mit MP kombiniert (27, 85, 151). Während der Studie wurden zwei verschiedene Dosierungsschemata verwendet. Ab Oktober 1983 wurde mit einem Radioimmunoassay⁶⁾ (RIA) regelmäßig der CSA Blutspiegel bestimmt (26). Die Dosierung erfolgte so, daß ein therapeutisch wirksamer Blutspiegel von 300-800 ng/ml erreicht wurde. Die CSA Gesamtdosis konnte dadurch gesenkt werden.

Genaue Dosierungsschemata zeigten die Tabellen 4 und 5.

1) Sandimmun^R, Sandoz AG, Basel, CH

2) Urbason^R, Hoechst AG

3) Kaninchen ALG, Merieux

Pferde ALG Pressimmun, Behring Werke, Marburg

4) ATG, Fresenius, Frankfurt

5) Imurek^R, Deutsche Wellcome GmbH

6) Ciclosporin RIA Kit^R, Sandoz AG, Basel, CH

Tabelle 5: Basistherapieschema bis Oktober 1983

Zeitraum po	CSA, mg/kg KG/Tag	MP, mg/kg KG/Tag
1. Monat	15	8
2. Monat	13	8
3. Monat	11	8
Weitere Reduktion bis 6. Monat	6	8

Tabelle 6: Basistherapieschema ab Oktober 1983

Zeitraum po	CSA, mg/kg KG/Tag	MP, mg/kg KG/Tag
bis 14. Tag	14	32

Wenn CSA-Spiegel im Normbereich (300-800 ng/ml)

15.-30. Tag	14	32
2. Monat	10	16
3. Monat	8	8
ab 4. Monat	6	8

ab 7. Monat evtl.
absetzen

CSA Spiegel 1000-1500 ng/ml : Dosisreduktion um 2 mg/kg KG
 CSA Spiegel > 1500 ng/ml : Dosisreduktion um 4 mg/kg KG

2.7.1.2 Basistherapieschema bei Risikopatienten

Zur Gruppe der Risikopatienten gehören diejenigen, bei denen eine Second-set (Zweitabstoßungs-) Reaktion nach den Wahrscheinlichkeitsregeln eher zu erwarten war. Dies waren Empfänger von Zweit- oder Dritttransplantaten, sowie Empfänger mit präformierten Antikörpern gegen mehr als 60 % der Panel-Zellen. Bei diesen Patienten wurde die Basisimmunsuppression während der ersten postoperativen

Woche mit einer Dreifachkombination durchgeführt, bestehend aus (83):

- CSA 15 mg/kg KG von Tag 0-7
- AZA 2 mg/kg KG von Tag 0-3
- AZA 1 mg/kg KG von Tag 3-7
- MP 500 mg am Tag 0, Reduktion bis auf 20 mg am Tag 7

Ab 2. postoperativer Woche wurde die Basisimmunsuppression wie unter 2.1.7.1 beschrieben fortgeführt.

2.1.7.3 Abstoßungstherapie

Die Therapie bei AR richtete sich danach, ob es sich um eine erstmals auftretende, eine zweite oder dritte, bzw. eine therapierefraktäre AR handelte. Das therapeutische Vorgehen war wie folgt:

1. AR : 500 mg MP tgl. über 3 Tage
2. u. 3., bzw. fortbestehende AR: 125 mg MP tgl. über 7 Tage, ALG oder ATG über 7 Tage
4. AR (bzw. zunehmende Funktionsverschlechterung unter Abstoßungstherapie bei 2. o. 3. AR)
erneut ALG o. ATG über 7 Tage
evtl. Konversion von CSA auf AZA als Basisimmunsuppression

Für die ALG/ATG Therapie wurden drei randomisierte Gruppen gebildet (16, 17, 69). Die erste Gruppe bekam 2,5 mg/kg KG Kaninchen ATG, die zweite 2,5 mg/kg KG Kaninchen ALG, die dritte 25 mg/kg KG Pferde ALG.

2.1.7.4 Therapie bei Virusinfektionen

Das therapeutische Vorgehen bei nachgewiesener VI richtete sich nach der Art des Erregers und nach der Schwere der klinischen Symptomatik.

EBV Infektionen konnten nicht therapiert werden und die Immunsuppression mußte nicht reduziert werden. Es wurden lediglich die Titerverläufe beobachtet.

HSV Infektionen wurden bei schwerer klinischer Symptomatik mit Acyclovir¹⁾ über 5 Tage behandelt. Die Immunsuppression mußte nicht reduziert werden.

Bei CMV Infektionen mußte die immunsuppressive Therapie geändert werden. MP wurde ganz abgesetzt. CSA wurde zunächst nur reduziert, bei Lebensgefahr ganz abgesetzt. Außerdem wurde mit CMV-Immunglobulin²⁾ in einer Dosierung von 2 ml/kg KG behandelt.

2.2 Zellgewinnung aus dem peripheren Blut

Von jedem Patienten wurde am Tag der FNB 5 ml venöses Blut entnommen und mit 50 I.E. Heparin versehen. Von Patienten mit V. a. eine systemische VI wurde auch ohne gleichzeitige FNB 5 ml Blut zur Untersuchung des MNK entnommen.

2.2.1 Differentialblutbild und Leukozytenzahl

Zur Berechnung von Lymphozytenabsolutwerten war die Leukozytenzahl/mm³ und das Differentialblutbild notwendig. Die Bestimmung der Leukozytenzahl wurde im Institut für Klinische Chemie der Universität durchgeführt.

Pro zu untersuchender Blutprobe wurden zwei Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und später zusammen mit den Zytozentrifugenpräparaten der FNB und des MNK gefärbt und differenziert.

2.2.2 Isolierung des mononukleären Konzentrates

2-3 ml Ficoll-Hypaque Lösung³⁾ (spez. Dichte 1,077 g/ml) wurden überschichtet mit 5 ml einer Suspension aus im Verhältnis 1:1 mit Tris-Hank'scher Lösung⁴⁾ verdünntem Blut. Nach zweiminütiger Zentrifugation⁵⁾ bei 1200 G (2800 U/min) entstand als Interphasering zwischen dem Gemisch aus

1) Zovirax^R, Deutsche Wellcome GmbH, Burgwedel

2) Cytotect^R, Biotest Pharma, Dreieich/Frankfurt

3) Ficoll-Hypaque Lösung, 1,077 g/ml, Klinikapotheke

4) Tris-Hank'sche Lösung, pH7,4, Klinikapotheke

5) Laborzentrifuge "Rotanta S", Fa. A. Hettich, Tuttlingen

Plasma/Tris-Hank'scher Lösung und der Ficoll-Hypaque Lösung das MNK. Es bestand vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten, während Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten im Bodensatz zu finden waren. Mit einer Pasteurpipette wurde der Interphasering abpipettiert, in Tris-Hank'scher Lösung resuspendiert und dreimal bei 600 G (1400 U/min) gewaschen. Nach Abgießen des Überstandes wurde die Zellsuspension durch Verdünnen mit Tris-Hank'scher Lösung auf $1 - 3 \times 10^6$ Zellen/mm³ eingestellt. Diese Zellsuspension diente zum Herstellen von Zytozentrifugenpräparaten und zur Markierung mit McAb.

2.2.3 Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate

Für jedes MNK wurden mindestens zwei Objektträger¹⁾ entfettet und beschriftet. Zusammen mit speziellen Filzkartons²⁾ zum Aufsaugen der Suspensionslösung und einer Zentrifugenküvette wurden die Objektträger in einen Blechschlitten eingespannt und in die Zytozentrifuge³⁾ eingehängt. Mit Eppendorfpipetten⁴⁾ wurden 10 ul bzw. 20 ul der mononukleären Zellsuspension in die Küvetten pipettiert und mit 150 ul Tris-Hank'scher Lösung verdünnt. Nach 5 minütiger Zentrifugation mit 300 G (500 U/min) wurden die Objektträger entnommen, luftgetrocknet und ungefärbt unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zelldichte sollte so gewählt sein, daß die Zellen einzeln nebeneinander lagen. Wenn die Zellen mehrere Schichten bildeten oder zu wenig Zellen auf dem Objektträger waren, mußten mit entsprechend veränderter Verdünnung neue Präparate angefertigt werden. Die Färbung erfolge anschließend mit den Ausstrichen und den Zytozentrifugenpräparaten der FNB.

1) Objektträger, 76 x 26, R. Langenbrinck, Emmendingen

2) Filter Cards, Cat. No. 599x45, Shandon

3) Zytozentrifuge mit Küvetten, Cytospin II, Shandon, Labortechnik GmbH, Hamburg

4) Eppendorf-Pipette 3130, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

2.2.4 Färbung nach Pappenheim

Blutausstriche, MNK und FNB wurden zusammen nach Pappenheim gefärbt (7, 54). Die luftgetrockneten Objektträger wurden auf einer Färbebank zur Fixierung 3 Minuten lang mit May-Grünwald Lösung¹⁾ überschichtet und anschließend mit Aqua bidest²⁾ abgespült. Täglich neu filtrierte, im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest verdünnte Giemsa Lösung³⁾ wurde 20 Minuten lang aufgetragen. Nach erneutem Abspülen mit Aqua bidest wurden die luftgetrockneten Präparate mit Salzsäure-Äthanol-Lösung⁴⁾ gereinigt. Abschließend wurden mit Eukitt⁵⁾ Deckplättchen⁶⁾ zum Schutz der Präparate aufgeklebt.

2.2.5 Mikroskopische Differenzierung

Zur Differenzierung der Ausstriche und der Zytozentrifugenpräparate wurde ein Standardmikroskop⁷⁾ und ein Zählgerät⁸⁾ verwendet. Der Beurteilung von Zelldichte und Qualität der Präparate diente die 120-fache Vergrößerung (12-fache Okular- u. 20-fache Objektivvergrößerung). Bei 1200-facher Vergrößerung mit Immersionsöl erfolgte die Auswertung der Präparate. Zunächst wurden je 100 Zellen der beiden Ausstriche, anschließend mindestens 2x100 Zellen je Präparat des MNK und der FNB ausgezählt. Als Ergebnis wurden die Mittelwerte berechnet.

1) May-Grünwald Stammlsg.. E. Merck, Darmstadt

2) Aqua bidest, aus zentraler Zuleitung

3) Giemsa Lsg., E. Merck, Darmstadt

4) Salzsäure-Äthanol-Lsg., Kliniksapotheke

5) Eukitt, O. Kindler, Freiburg i. Br.

6) Deckplättchen, 18x18, Fa. Menzel, bezogen über Fa. Emp-fenseder, München

7) Zeiss Mikroskop, Standard 18, Zeiss, Oberkochen

8) Zählgerät, Leucodiff 600, Instrumentation Laboratory
Boskamp GmbH

2.2.5.1 Differenzierung des mononukleären Konzentrats

Nach zytologischen Kriterien wurden folgende Zellarten der Lympho- und Granulopoese sowie Monozyten differenziert (7, 136):

- Kleine Lymphozyten: Kleine, runde Zellen von 7 - 10 μm Durchmesser. Der Kern mit dicht strukturiertem Chromatin nimmt fast die ganze Zellgröße ein.
- Große Lymphozyten: 10 - 16 μm große Zellen mit rundem oder ovalem, randständigem Kern und dichtem Chromatin. Breiteres Zytoplasma als kleine Lymphozyten.
- LGL (7, 41): 15 - 18 μm messende Zellen mit rundlichem oder niereenförmigen Kern und dichtem Chromatin. Azurophile Granula in graublauem Zytoplasma, meist in einer perinukleären Aufhellung gelegen.
- ALy: 10 - 16 μm große Zellen mit schollig aufgelockertem Chromatin und evtl. erkennbaren Nukleoli. Kern-Plasma-Relation zugunsten des Plasma verschoben. Zunehmende Plasmasbasophilie.
- LB: 25 - 30 μm große Zelle mit aufgelockertem Chromatin und meistens sichtbaren Nukleoli. Tiefblaues Zytoplasma deutet auf Plasmasblasten, hellblaues Zytoplasma eher auf Lymphoblasten hin.
- Juvenile Granulozyten: 12 - 16 μm große Zellen mit meist bohnenförmigem, randständigem Kern

und rötlich-violettem, grobscholligem Chromatin. Blaßrosa Zytoplasma mit basophilen, eosinophilen oder neutrophilen Granula.

- Stabkernige Granulozyten: 10 - 16 μm große Zellen mit stabförmig, unregelmäßig gebogenem Kern, dessen Einschnürungen $1/3$ der durchschnittlichen Kerndicke nicht überschreiten.
- Segmentkernige Granulozyten: 10 - 15 μm große Zelle mit 2 - 5 über fadenförmige Brücken verbundenen Kernsegmenten. Rötlich-violettes, grobscholliges Chromatin. Unterteilung in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten entsprechend dem Färbeverhalten der Granula.
- Monozyten: 15 μm (kleine M.) - 20 μm (große M.) messende Zellen mit nierenförmig bis vielgestaltig gelapptem randständigen Kern. Graublaues Zytoplasma. Vakuolen bei Überangsformen zu Makrophagen.

2.2.6 Errechnung der Absolutzahlen für Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen

Aus der Leukozytenzahl/ mm^3 und dem Prozentsatz der Lymphozyten im Differentialblutbild errechnete sich die Anzahl der Lymphozyten/ mm^3 . Die Absolutzahlen der LYSP ergaben sich wie folgt: Es wurde das Verhältnis aus der prozentualen Häufigkeit der LYSP und der Gesamtl lymphozyten im MNK gebildet. Dieses Verhältnis multipliziert mit der Anzahl der Lymphozyten im p.B. ergab die Absolutzahlen/ mm^3 der LYSP.

2.2.7 Zellmarkierung mit monoklonalen Antikörpern

2.2.7.1 Methode der indirekten Immunfluoreszenz

Bei der Methode der indirekten Immunfluoreszenz bindet in einer ersten Phase ein McAb an ein spezifisches Antigen der Zelloberfläche. In einer zweiten Phase markiert ein gegen den primären Antikörper gerichteter zweiter Antikörper dessen Antigenstruktur. Dieser zweite Antikörper ist mit einer Substanz konjugiert, die zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

Die Antikörper lagen in lyophilisierter Form vor. Sie wurden in 1 ml Aqua bidest aufgelöst und mit 0,9 % NaCl-Lösung 1:100 verdünnt. Zu 100 µl der mononukleären Zellsuspension (s. 2.2.2) wurden jeweils 30 µl der Antikörperlösung gegeben und 45 - 60 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt und bei 300 G zentrifugiert. Der Überstand mit dem Anteil nichtgebundener Antikörper wurde abgesaugt. Da alle Primärantikörper von der Maus stammten, wurde als Sekundärantikörper einheitlich ein Fluoreszein konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper¹⁾ verwendet (6). 30 µl der 1:10 verdünnten Antikörperlösung wurden der Zellsuspension zugegeben und diese nochmals für 40-60 min. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Auswaschen der nichtgebundenen Antikörper wurde der Überstand bis auf 30-50 µl abgehoben und die nun doppelt markierte Zellsuspension sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop differenziert. Bei jeder Untersuchung wurde zum Ausschluß einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers eine Zellsuspension ohne Primär-, nur mit Sekundärantikörper inkubiert.

1) Goat-Anti-Mouse IgG-FIIC, Code No. G 250, Tago Inc.
Burlingame CA 94010, USA

2.2.7.2 Verwendete monoklonale Antikörper

Der McAb OKT 3¹⁾ bindet an Oberflächenstrukturen reifer Thymozyten und peripherer T-Lymphozyten. Unter bestimmten Umständen werden diese dadurch zur Proliferation angeregt (22, 127, 161, 162).

Die T-Lymphozytensubpopulation der "helper/inducer" Zellen wird von dem McAb OKT 4²⁾ markiert (126, 128). Die Killer/Suppressor T-Lymphozyten wurden mit dem McAb OKT 8³⁾ erfaßt. Eine weitere Unterscheidung zwischen diesen beiden Subpopulationen ist mit McAb bisher nicht möglich (127, 154).

Der McAb OKT 10⁴⁾ reagiert mit frühen hämatopoetischen Stammzellen, sowie mit aktivierten B- und T-Lymphozyten. Da die hämatopoetischen Stammzellen unter normalen Bedingungen im p.B. nicht vorkommen, wurden mit diesem McAb ALY markiert.

Der McAb MOAK 5202⁵⁾ ist gegen B-Lymphozyten gerichtet. Er reagiert auch mit aktivierten T-Zellen. Eine geringe Kreuzreaktion mit Subpopulationen der Monozyten und Makrophagen, sowie mit einigen O-Zellen ist möglich (173). DR-Antigene markiert der McAb Anti-Ia75⁶⁾. Diese Antigene sind auf 90 % der B-Lymphozyten, auf aktivierten T-Lymphozyten und auf Monozyten zu finden.

2.2.7.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Das indirekt markierte MNK (s. 2.2.7.1) wurde unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop⁷⁾ ausgewertet. Dazu wurde mit einer Pasteurpipette ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Bei 400-facher Vergrößerung wurden mindestens 2x100 Zellen

1), 2), 3), 4) Orthoclone OKT Warenbezeichnung der Fa. Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, N.J. 08869, USA

5) Oy Medix AB, PB 819, SF 000101 Helsinki 10

6) BMA 020, E. v. Behring Werke, Marburg

7) Zeiss Universal Foto Mikroskop, Zeiss, Oberkochen

gezählt. Unter Verwendung spezieller Filter¹⁾ und einer Halogenlampe²⁾ erscheinen die Zellen im Dunkelfeld rot und die fluoreszierenden Antikörper leuchten grün. Durch Ansammlung der Oberflächenantigene an einem Zellpol (sog. "capping") wird die Intensität der Fluoreszenz lokal verstärkt (72).

2.3 Zellgewinnung aus der Transplantatniere

Zur Gewinnung der Zellen aus der Transplantatniere diente die FNB.

2.3.1. Feinnadelaspirationsbiopsie

Die Transplantatniere wurde in der Fossa iliaca palpatorisch lokalisiert, das Hautareal darüber sorgfältig desinfiziert³⁾ und dann mit einem Lochtuch⁴⁾ steril abgedeckt. Eine 20 ml Spritze mit steril abgefülltem und mit EDTA versehenem Nährmedium⁵⁾ war vorbereitet und in einem Camecongriff⁶⁾ eingespannt. Die Biopsienadel⁷⁾ wurde unterhalb der Wunde ohne Lokalanästhesie in einen Nierenpol eingestochen. Pulssynchrones Vibrieren der Nadel zeigte die richtige Lage an. Die Spritze wurde auf die Nadel aufgesetzt und unter ständigem Sog und vibrierenden Bewegungen 2 cm im Nierenparenchym auf und ab bewegt. Weiterhin unter Sog wurde die Nadel zurückgezogen. Um möglichst viel Material zu gewinnen wurde anschließend die Nadel mehrmals mit Nährmedium durchgespült. Auf diese Weise konnten ca. 10 µl repräsentatives Zellmaterial gewonnen werden, das allerdings unterschiedlich stark mit Blut kontaminiert war. Um diese Kontamination bei der Auswertung auszuschalten,

1) Objektive: Ph2, Plan 40/0, 65; 160/0,17 Neoflur 40/0, 75; 160,17

2) Halogenleuchte 12V, 100 W

3) Wundbenzin, Kodan, Kliniksapotheke

4) Lochtuch, Sengewald GmbH, Rosenheim

5) RPMI-1640 Medium mit 1 ml 1M Hepespuffer/l u. 250 mg EDTA/l

6) Camecongriff, Camecon AB 8305, Täby, Schweden

7) Spinal Needle, B-D & Luer Lock, Becton & Dickinson Co.

wurden 1-2 Tropfen p.B. in ebenfalls 5 ml Nährmedium gespritzt. Die Weiterverarbeitung von FNA und p.B. hatte möglichst rasch zu erfolgen (47, 52, 112, 167).

2.3.2 Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate

Die Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate erfolgte prinzipiell wie unter 2.2.3 beschrieben.

Es wurden 200 µl des unverdünnten FNA in die Küvetten pipettiert. Erwies sich das Präparat bei der Kontrolle als zu dicht, wurden entsprechende Verdünnungen mit 0,9 % NaCl Lsg. hergestellt. Waren zu wenig Zellen auf dem Objektträger, wurde das FNA zentrifugiert, der Überstand abgeegossen, der Bodensatz mit 500 µl 0,9 % NaCl Lsg. aufgeschwemmt und erneut Zytozentrifugenpräparate hergestellt. Auch aus der Probe des p.B. in Nährmedium wurden mit 200 µl Zytozentrifugenpräparate angefertigt. Nach Lufttrocknung erfolgte dann die Färbung nach Pappenheim (s. 2.2.4.9).

2.3.3 Mikroskopische Differenzierung des Feinnadelaspirates

Das technische Vorgehen war wie unter 2.2.5 beschrieben. Abgesehen von den unter 2.2.5.1 aufgezählten Zellarten konnten im FNA noch folgende NGZ differenziert werden: Endothelzellen und Tubuluszellen aus dem proximalen und distalen Tubulus. Diese Zellen wurden morphologisch beschrieben und ihre Anzahl/100 Leukozyten bestimmt (48, 46, 136, 167).

2.3.4 Erstellung des Corrected Increment

Das FNA wurde nach den Kriterien des von P. HÄYRY et al. erstellten CI bewertet (46, 48, 50, 51, 52, 171, 172). Bei dieser Methode wird jedem Zelltyp entsprechend seiner vermuteten immunologischen Potenz ein Faktor zugeordnet. Vom prozentualen Anteil jeder Zellpopulation im FNA wird

der prozentuale Anteil im p.B. abgezogen, um so die Kontamination der inflammatorischen Zellen durch Zellen des p.B. rechnerisch zu eliminieren. Dieses Increment wird mit einem Korrekturfaktor multipliziert. Die Summe der so errechneten CI jeder einzelnen Zellart ergibt ein Maß für die Aggressivität der ZTR.

Um sicher zu sein eine repräsentative Verteilung der im Transplantat vorkommenden Zellarten zu haben, wurden nur FNA mit mindestens 7 NGZ/100 inflammatorische Zellen bewertet. Auf die Beurteilung der NGZ hinsichtlich Zeichen einer ATN oder von CSA-Toxizität wurde im Rahmen dieser Studie nicht eingegangen.

Tabelle 7: Multiplikationsfaktoren zur Erstellung der CI entsprechend der geschätzten immunologischen Potenz jeder Zellart

LB	1,0
ALy	0,5
LGL	0,2
Lymphozyt	0,1
Granulozyt	0,1
Monozyt	0,2
Makrophage	1,0

2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet, die im Text mit STAT I und STAT II gekennzeichnet sind.

STAT I: Beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen wurde der multiple Test nach Bonferroni-Holm angewendet. In den dazugehörigen Graphiken wurden die Mediane, die 25 % um den Median verteilten Werte, sowie Minimal- und Maximalwert aufgetragen.

STAT II: Zwei unabhängige Gruppen wurden entsprechend dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verglichen. Graphisch wurden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Mononukleäre Zellen in Transplantat und peripherem Blut bei zellulärer Transplantatreaktion

3.1.1 Anzahl und Verteilung der FNB

Bei 55 Patienten nach allogener Nierentransplantation wurden insgesamt 155 FNB durchgeführt. Zum Zeitpunkt der FNB bestand weder klinisch noch serologisch ein Anhalt für eine bakterielle oder virale Infektion. Aus den 155 FNB resultierten 145 auswertbare FNAC (92 % der FNB).

Die erste FNB wurde frühestens am 2. po Tag durchgeführt. Bei komplikationslosem Verlauf wurden diese durchschnittlich in 3tägigem (2-5tägigem) Abstand bis zur Entlassung des Patienten wiederholt.

Aus diagnostischer Indikation wurden auch Patienten in ambulanter Nachsorge biopsiert. Die späteste FNB erfolgte am 281. Tag nach Transplantation. Einmalige FNB wurden durchgeführt, wenn eine Stanzbiopsie zur Gewinnung eines histologischen Präparates notwendig war.

Die Anzahl der FNB/Patient gibt Tabelle 8 wieder.

Tabelle 8: Anzahl der FNB/Patient

FNB/Patient	n Patienten
1	16
2-3	25
4-5	7
> 5	7
	55

Der Zeitpunkt der FNB nach Transplantation ist der folgenden Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Zeitpunkt nach Transplantation und Anzahl der FNB

Zeitpunkt nach Transplantation	n FNB	n Patienten
- 14 Tage	76	22
- 1 Monat	43	14
- 2 Monate	14	10
- 3 Monate	4	2
> 3 Monate	18	7
	155	55

Für die 145 auswertbaren FNAC wurde wie unter 2.3.6 angegeben das CI berechnet. Entsprechend den erhaltenen CI-Werten wurden 3 Gruppen gebildet.

CI < 3 = keine - geringgradige ZTR = ZTR I
 CI 3-6 = mittelgradige ZTR = ZTR II
 CI > 6 = schwere ZTR = ZTR III

Auf diese ZTR-Gruppen verteilen sich die FNAC wie folgt:

Tabelle 10: Verteilung der FNAC auf die ZTR-Gruppen

ZTR-Gruppe	n FNAC
ZTR I	85
ZTR II	42
ZTR III	18
	145

3.1.2 Anzahl und Verteilung der mononukleären Konzentrate

Von den unter 3.1.1 genannten 55 Patienten wurden aus dem p.B. wie unter 2.2.2 beschrieben 144 MNK isoliert. Die Blutentnahme erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der FNB. Die Verteilung der MNK auf die ZTR-Gruppen war identisch mit der Verteilung der FNAC und kann Tabelle 10 entnommen werden.

3.1.3 Mononukleäre Zellen im Transplantat

Die MNZ der 145 auswertbaren FNAC wurden wie unter 2.3.5 beschrieben differenziert. Folgende Zellpopulationen wurden ausgezählt: LB, ALy, LGL, Lymphozyten und Monozyten. Der Einfluß des p.B. wurde zunächst nicht berücksichtigt, d.h. es wurde kein Increment gebildet. Abbildung 1 zeigt die prozentuale Verteilung der differenzierten Zellarten in den drei ZTR-Gruppen.

LB kommen bei ZTR I und II nur in Einzelfällen vor. Bei ZTR III findet sich im Transplantat ein signifikant höherer Anteil an LB ($p < 0,016$).

Die Zahl der ALy steigt parallel mit zunehmendem Schweregrad der ZTR. Die durchschnittlichen Häufigkeiten der ALy in den 3 ZTR-Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,016$). LGL sind bei ZTR II und III signifikant häufiger im Transplantat zu finden als bei ZTR I ($p < 0,016$). ZTR II und III unterscheiden sich in Bezug auf LGL nicht.

Der größte Unterschied zwischen den Gruppen besteht im Anteil der Lymphozyten an den infiltrativen MNZ des Transplantates. Bei ZTR I machen sie im Median 9 %, bei ZTR II 25 % und bei ZTR III 41 % der Zellen in der FNAC aus. Die Gruppen ZTR II und III zeigen dabei untereinander einen geringeren Unterschied ($p < 0,05$) als gegenüber der Gruppe ZTR I ($p < 0,016$).

Das gleiche Verteilungsmuster findet sich bei den Monozyten im Transplantat: ZTR II und III unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Median ZTR II: 15 %, Median ZTR

III: 16 %). Die Anzahl der Monozyten in der Gruppe ZTR I ist signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen (Median: 8 %, $p < 0,016$).

3.1.3.1 Increment mononukleärer Zellen im Transplantat

Um bei einem gut durchbluteten Organ wie der Niere den Effekt des p.B. auf die Zusammensetzung der FNAC auszuschalten, wurde ein Increment der MNZ im Transplantat gebildet. Dazu wurde für jede Zellart verfahren wie unter 2.3.6 beschrieben, jedoch auf die Multiplikation mit dem Korrekturfaktor verzichtet.

Abbildung 2 gibt das Ergebnis wieder.

Gegenüber den nicht um die Blutkontamination korrigierten Werten ist das Verteilungsmuster nicht grundsätzlich verschieden.

Die schwere ZTR III ist durch einen signifikant höheren Anteil an LB gekennzeichnet. ALy steigen parallel zur Schwere der ZTR an. LGL kommen bei ZTR II und III signifikant häufiger vor als bei ZTR I ($p < 0,05$).

Der größte Unterschied zwischen den ZTR-Gruppen besteht auch nach Korrektur der Blutkontamination bei den Lymphozyten (ZTR I: ZTR III und ZTR I: ZTR II, $p < 0,016$; ZTR II : ZTR III, $p < 0,05$).

Monozyten sind verteilt wie ohne Korrektur der Blutkontamination: ZTR II und III unterscheiden sich nicht signifikant untereinander, aber gegenüber ZTR I ($p < 0,016$).

3.1.3.2 Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl im Transplantat

Es wurde der Prozentsatz der LYSP an der Gesamtzahl der Lymphozyten für jede ZTR-Gruppe bestimmt. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob Zunahmen einzelner LYSP auf einer Vermehrung der Gesamtlymphozyten beruhten, oder ob einzelne Subpopulationen überproportional anstiegen, d.h. eine qualitative Veränderung der ZTR stattfand. Abbildung 3 gibt das Ergebnis wieder.

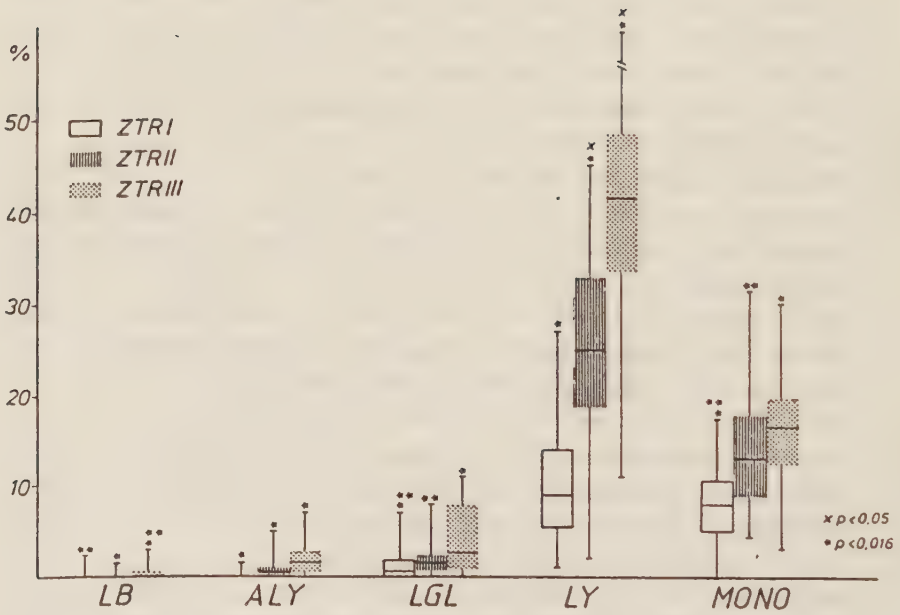


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der MNZ in der FNB;
(STAT I)

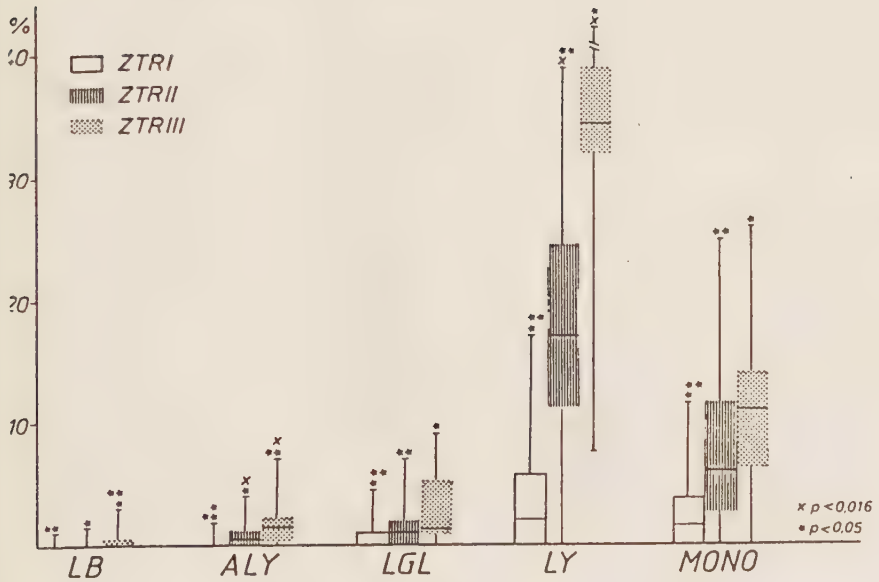


Abbildung 2: Increment MNZ in der FNB
(STAT I)

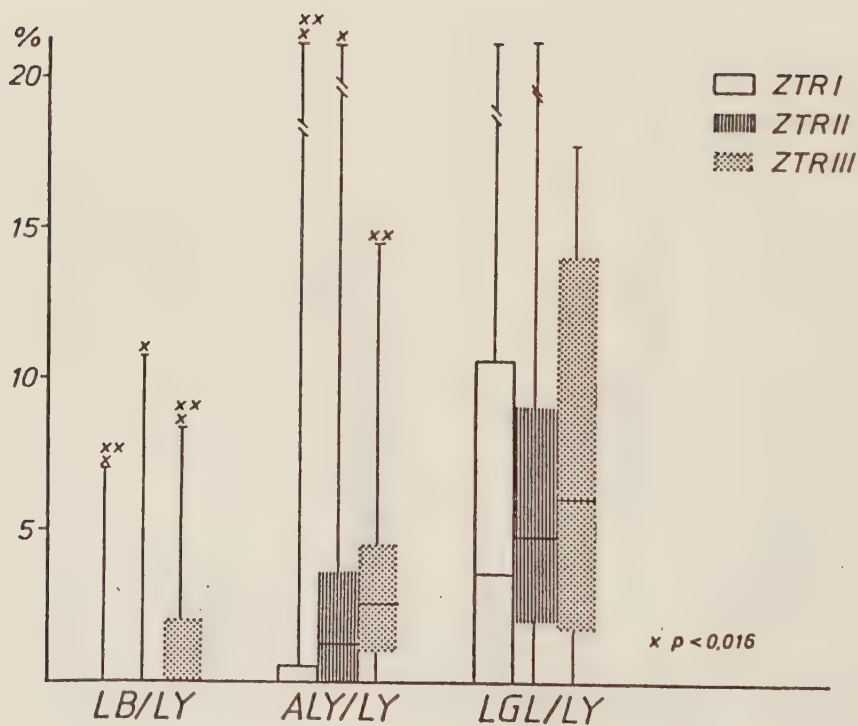


Abbildung 3: LYSP/Gesamtlymphozyten in der FNB
(STAT I)

Der Anteil der LB ist bei ZTR III signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,016$). Die Anzahl der ALy/LY ist in den Gruppen ZTR II und III nicht so stark verschieden. Bei ZTR I bilden diese Zellen einen signifikant geringeren Prozentsatz der Lymphozyten ($p < 0,016$). LGL/LY kommen bei allen Schweregraden der ZTR gleich häufig vor.

3.1.4 Mononukleäre Zellen im peripheren Blut

Wie in 3.1.2 beschrieben, wurde die Verteilung der MNZ im p.B. zum gleichen Zeitpunkt wie im Transplantat untersucht. In Abbildung 4 ist die prozentuale Verteilung der LB, ALy, LGL, Lymphozyten und Monozyten im MNK bei ZTR I-III aufgetragen.

Im p.B. ist im Gegensatz zur Verteilung der MNZ im Transplantat zwischen keiner der untersuchten Gruppen ein Unterschied festzustellen.

Lymphozyten (Median 42-45 %) und Monozyten (Median 35-40 %) sind bei ZTR I-III ohne wesentliche Abweichungen die häufigsten Zellen im MNK. In allen Gruppen kommen LB, ALy und LGL nur in geringen Prozentzahlen vor. Ein Anstieg dieser Zellarten, wie er in der FNAC bei zunehmendem Schweregrad der ZTR zu beobachten ist, ist im p.B. nicht festzustellen.

3.1.4.1 Absolutzahlen der Lymphozytensubpopulationen

Die Werte für die Absolutzahlen der LYSP im p.B. wurden, wie unter 2.2.6 ausgeführt, errechnet.

Abbildung 5 zeigt die Zellzahlen der LB, ALy und LGL/mm³ Blut.

Wie schon bei der prozentualen Verteilung der MNZ im p.B. gefunden, unterscheiden sich auch die Absolutzahlen der differenzierten Zellen zwischen keiner der ZTR-Gruppen signifikant.

LB kommen bei ZTR I und II in 25 %, bei ZTR III in 50 % der Fälle im MNK vor. Die Mediane liegen jedoch in allen drei

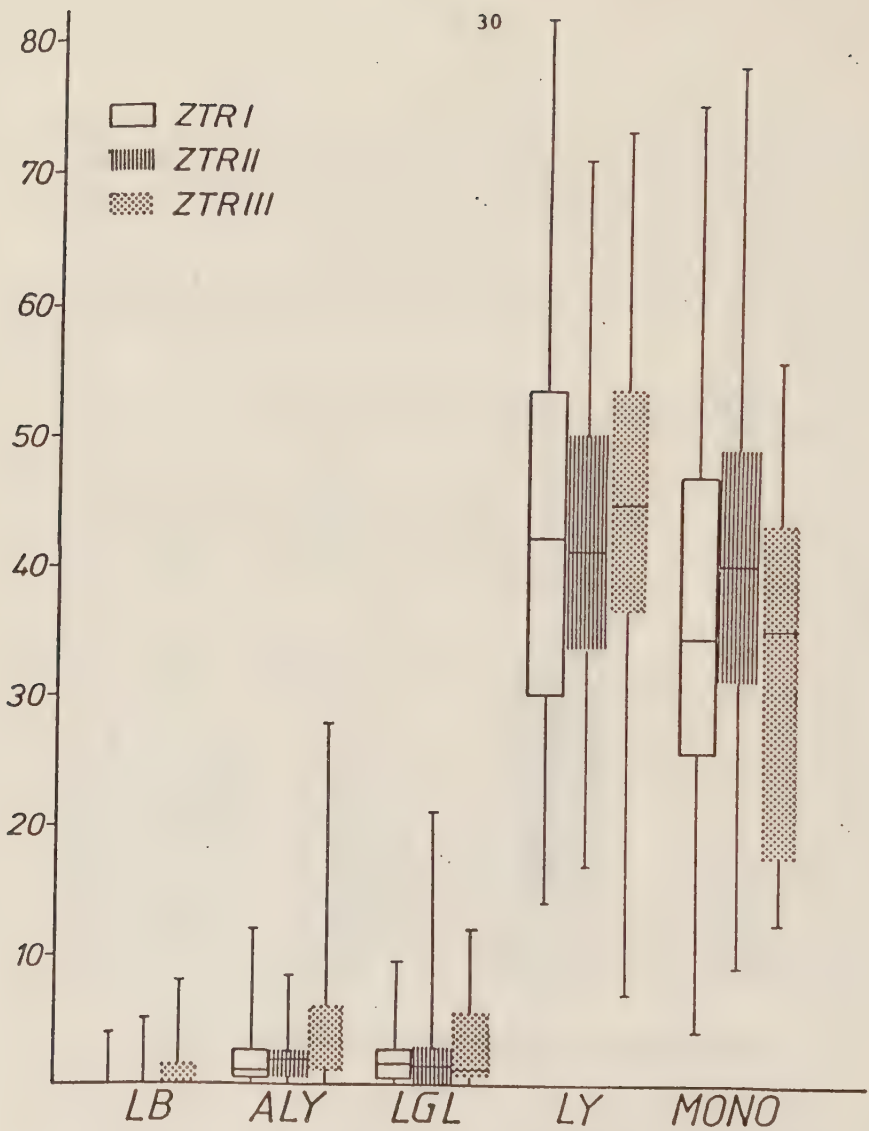


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der MNZ im p.B.
(STAT I)

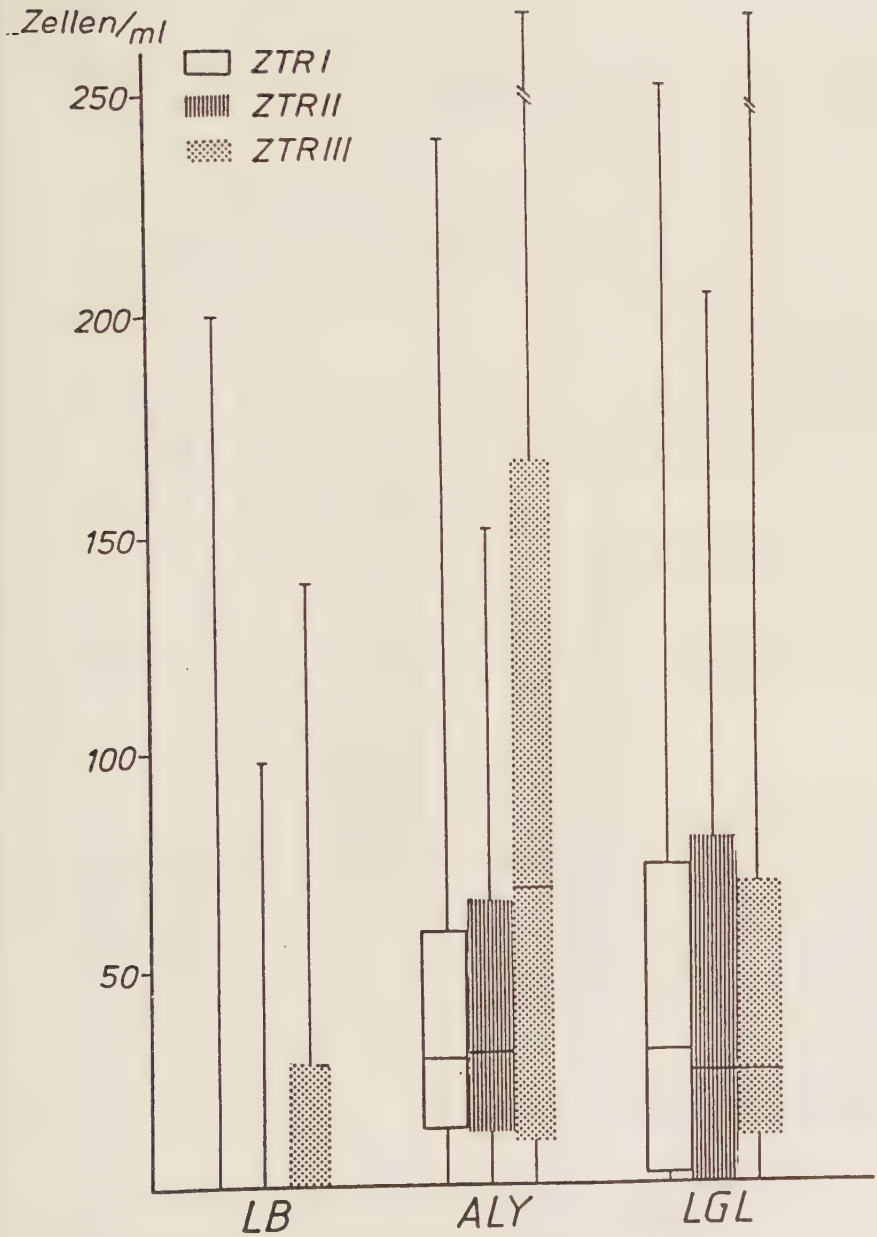


Abbildung 5: Absolutzahlen der LYSP im p.B.
(STAT I)

Gruppen bei 0 Zellen/mm³. Aufgrund der weiten Spanne der Zellverteilung (0-200 Zellen/mm³) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

ALy lassen sich in allen drei Gruppen in über 75 % der Fälle differenzieren. In der Gruppe ZTR III liegt der Median der Zellverteilung doppelt so hoch (68 ALy/mm³) wie in den beiden anderen Gruppen (30 ALy/mm³). Durch die weite Spanne der Zellverteilung ist jedoch dieser Unterschied nicht signifikant.

Die durchschnittlichen Absolutzahlen der LGL sind bei ZTR I-III nahezu identisch. Weder die Mediane (26-31 LGL/mm³) noch die Werte der Verteilung zeigen große Unterschiede.

3.1.4.2 Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl

Die Berechnung der LYSP/Gesamtlymphozyten ermöglicht es, Änderungen innerhalb der Lymphozytenpopulation zu erfassen.

In Abbildung 6 sind die LYSP/LY graphisch dargestellt.

Die Schweregrade der ZTR unterscheiden sich in differenzierten LYSP nur trendmäßig voneinander. Ein höherer Anteil LB/LY wird zwar bei ZTR III beobachtet, der Median liegt aber in allen Gruppen bei 0 LB/LY. Bedingt durch die weitgespannte Verteilung sind die Unterschiede nicht signifikant.

ALy/LY steigen nur tendentiell mit dem Schweregrad der ZTR an (Mediane, ZTR I: 2,2 %; ZTR II: 4,1 %; ZTR III: 4,9 %). LGL bilden in allen drei Gruppen ungefähr 3 % der Lymphozyten (Mediane: 2,5 - 3,5 %).

3.1.5 Mononukleäre Zellen in Transplantaten mit und ohne Blastzellen

130 FNAC wurden untersucht ob sie Blastzellen enthielten. Unter dem Begriff Blastzellen sind LB und ALy zusammengefaßt. Es wurden zwei Gruppen gebildet: FNAC mit

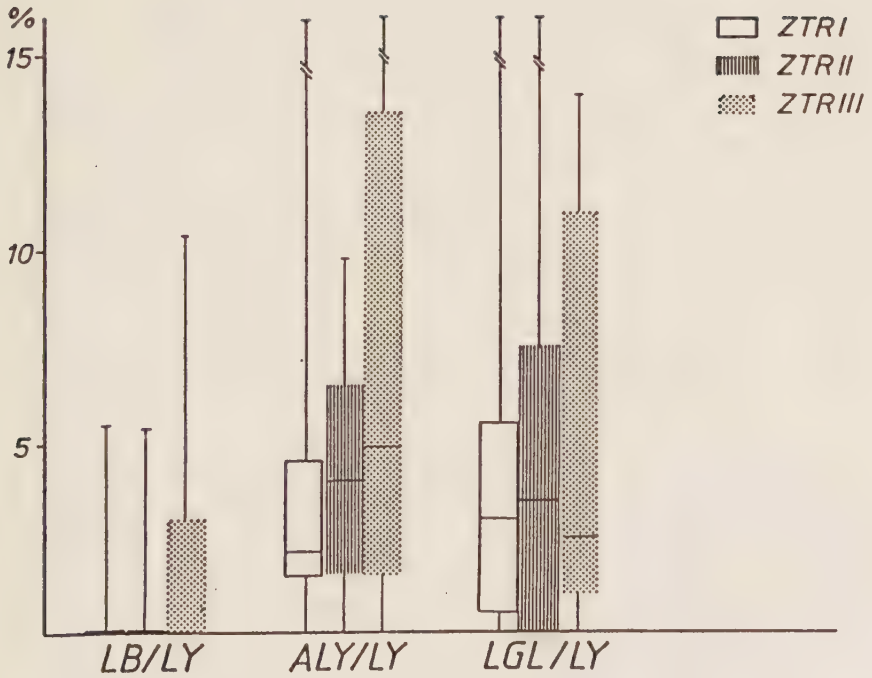


Abbildung 6: LYSP/Gesamtlymphozyten im p.B.
(STAT I)

und FNAC ohne Blastzellen. Verglichen wurde jeweils das Increment der MNZ, d.h. die um die Blutkontamination korrigierten Werte. Die MNK des p.B. wurden entsprechend der dazugehörigen FNAC ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt.

Diese Einteilung ermöglichte unabhängig vom errechneten Wert des CI zu untersuchen, wie die MNZ zum gleichen Zeitpunkt im Transplantat und im p.B. verteilt sind (Abbildung 7). Es wird deutlich, daß in Transplantaten, die Blastzellen enthalten, signifikant mehr LGL vorkommen, als in Transplantaten ohne Blastzellen. FNAC mit Blasten enthalten bis maximal 9 % LGL (Median 1 %), FNAC ohne Blastzellen maximal 3,5 % (Median 0 %).

In Transplantaten mit Blastzellen finden sich auch signifikant ($p < 0,025$) mehr Lymphozyten als in solchen ohne Blasten (Median mit Blastzellen: 11 %, ohne Blastzellen, 4,5 %). Bei den Monozyten besteht kein Unterschied.

3.1.5.1 Mononukleäre Zellen im peripheren Blut von Transplantaten mit und ohne Blastzellen

In Abbildung 8 ist die prozentuale Verteilung der MNZ im p.B. für die Gruppen der Transplantate mit und ohne Blastzellen wiedergegeben. Die Anzahl n beträgt 53 für die Gruppe mit Blasten und 77 für die Gruppe ohne Blastzellen. Das p.B. zeigt zwischen den Gruppen keinen Unterschied in den differenzierten Zellarten.

LB kommen zwar in 50 % der Transplantate mit Blastzellen auch im p.B. vor, dagegen nur in 25 % der Transplantate ohne Blasten. Die Mediane der Verteilungen sind jedoch identisch (Median: 0 %) und der Unterschied ist nicht signifikant. ALy sind ebenfalls häufiger im p.B. von Transplantaten mit Blastzellen zu finden, aber auch dieser Unterschied ist nicht signifikant (Mediane, mit Blasen: 1,5 %, ohne Blasten: 1 %).

Die Verteilung der LGL (Mediane, mit Blasten: 1,5 %; ohne Blasten: 1 %), der Lymphozyten (Mediane, mit Blasten 45 %; ohne Blasten: 41 %) und der Monozyten (Mediane, mit

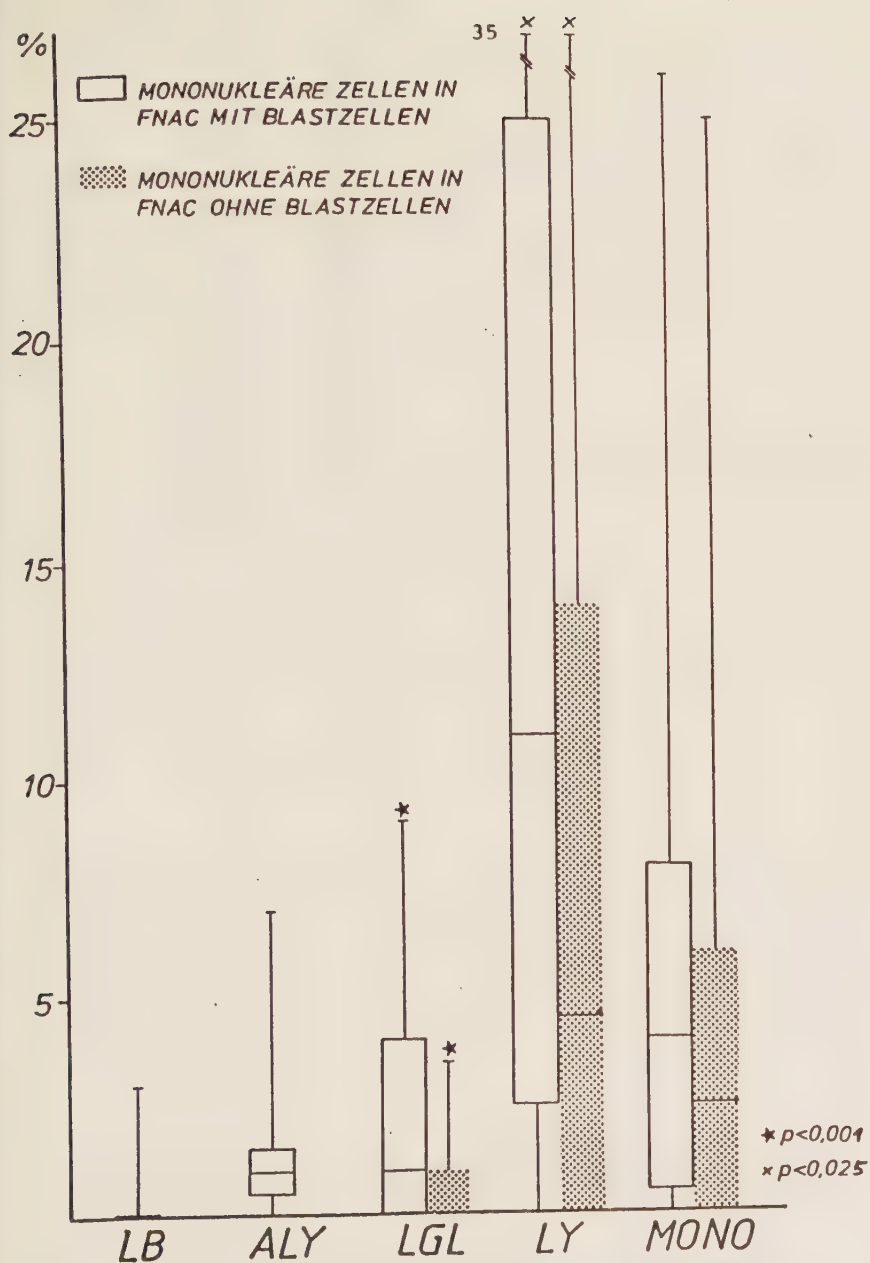


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der MNZ in der FNB
(STAT I)

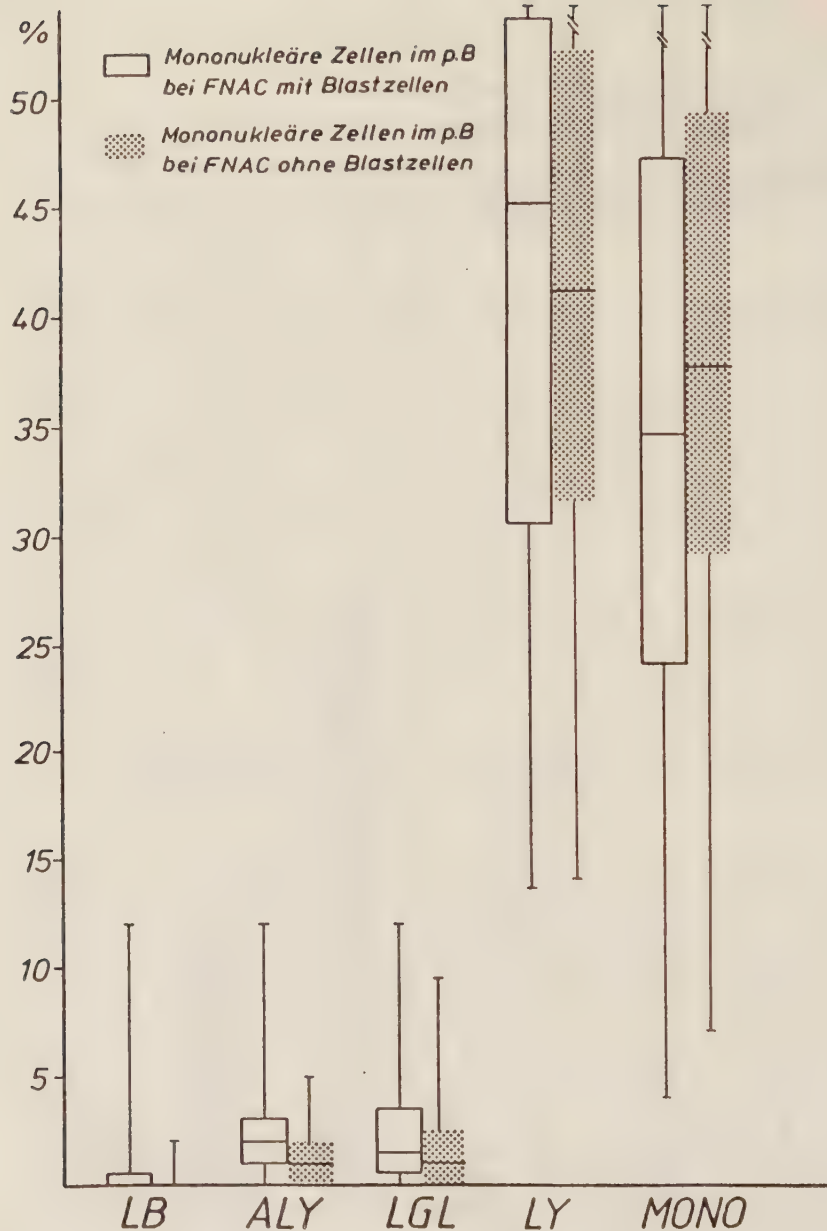


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der MNZ im p.B.
(STAT I)

Blasten: 34,5 %; ohne Blasten: 37,5 %) ist in beiden Gruppen fast identisch.

Der Vergleich der MNZ in Transplantaten mit und ohne Blastzellen sowie im dazugehörigen p.B. zeigt: Unterschiede in der Verteilung der MNZ in der FNAC werden zum gleichen Zeitpunkt im MNK nicht beobachtet.

3.2 Mononukleäre Zellen in Transplantat und peripherem Blut bei schwerer zellulärer Transplantatreaktion (ZTR III) und Virusinfektion

Die Differentialdiagnose zwischen schwerer ZTR und VI nach Nierentransplantation stellt klinisch oft ein Problem dar. In dieser Studie wurde versucht mit zytologischen und immunologischen Methoden eventuelle Unterschiede in der Verteilung MNZ in Transplantat und p.B. aufzudecken.

3.2.1 Anzahl und Verteilung der FNB

Von 12 Patienten mit ZTR III wurden 18 FNAC und von 5 Patienten mit serologisch nachgewiesener VI (s. 2.1.6.2) 7 FNAC ausgewertet. Unter den VI waren 3 frische CMV-Infektionen, eine CMV- und eine HSV-Reaktivierung.

	ZTR III	VI
n Patienten	12	5
FNAC	18	7

3.2.2 Anzahl und Verteilung der mononukleären Konzentrate

Von den unter 3.2.1 genannten 12 Patienten mit ZTR III wurden 17 MNK des p.B. untersucht. 22 MNK stammten von Patienten, welche die unter 2.1.6.2 genannten Kriterien einer VI erfüllten.

Es wurden unter den VI 9 CMV-, 2 HSV- und 1 EBV-Infektion diagnostiziert. Vier CMV-Erkrankungen waren frische

Infektionen, 5 waren Reaktivierungen. Die HSV- und EBV-Fälle waren ausschließlich Reaktivierungen.

Von den 9 CMV-Infektionen traten 7 im 2. po-Monat auf und je eine im 4. und 5. Monat nach Transplantation. Die beiden HSV-Infektionen wurden im 2. bzw. 3. Monat, die EBV-Reaktivierung im 10. Monat nach Transplantation nachgewiesen.

3.2.3 Mononukleäre Zellen im Transplantat

Gemäß den in 2.3.5 beschriebenen Kriterien wurden LB, ALy, LGL, Lymphozyten und Monozyten differenziert. Der Einfluß des p.B. auf die MNZ im Transplantat blieb zunächst unberücksichtigt, d.h. es wurde kein Increment gebildet.

In Abbildung 9 ist die prozentuale Verteilung der MNZ im Transplantat bei ZTR III und VI dargestellt.

LB kommen, wenn auch nur in geringem Prozentsatz, in 6 von 18 FNAC bei ZTR III vor. In keiner der 7 FNAC bei VI werden LB gefunden. Aufgrund der geringen Fallzahlen ist dieser Unterschied nicht signifikant. Die Mediane liegen in beiden Gruppen bei 0 %.

Der Anteil der ALy an den inflammatorischen Zellen in der FNAC liegt bei ZTR III höher (Median: 1,5 %) als bei VI (Median: 0,5 %). Bedingt durch die weit gestreute Verteilung der ALy (ZTR III: 0 - 7 %; VI: 0 - 5,5 %) ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied. LGL finden sich in durchschnittlich höherem Prozentsatz in FNAC von Virus-infizierten (Median: 5 %, Spanne 2,5 - 8 %), als in FNAC von Patienten mit ZTR III (Median: 2,5 %, Spanne 0 - 11 %). Der Unterschied ist aber nicht signifikant ($p < 0,1$).

Der Anteil der Lymphozyten im Transplantat ist sowohl bei VI als auch bei ZTR III innerhalb der Gruppen sehr unterschiedlich. Trotz deutlich anderer Lage der Mediane (ZTR III: 41,5 %; VI 32 %) unterscheiden sich die Gruppen nur auf dem 10 % Level.

Monozyten kommen bei VI in signifikant geringerem Prozentsatz in der FNAC vor, als bei ZTR III (Mediane, VI: 9,5; ZTR III: 16 %; $p < 0,05$).

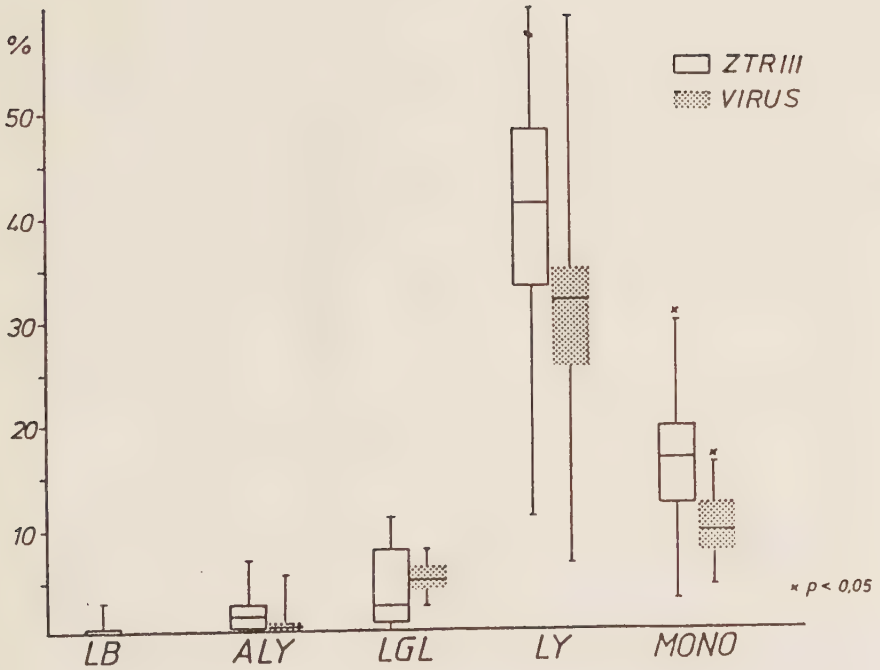


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der MNZ in der FNB
(STAT I)

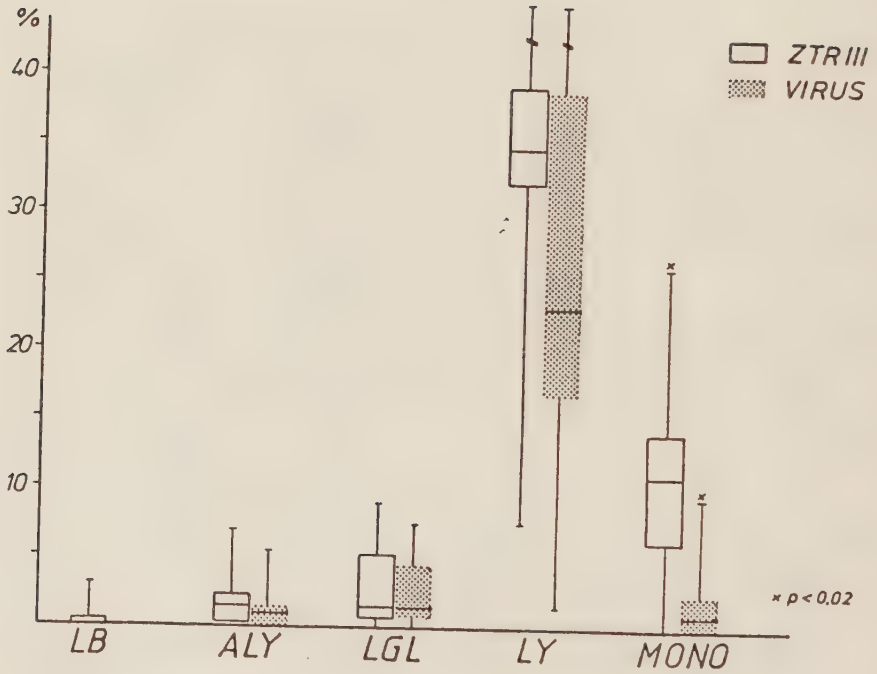


Abbildung 10: Increment MNZ in der FNB
(STAT I)

3.2.3.1 Increment mononukleärer Zellen im Transplantat

Für jede Zellart wurde die Differenz der Zellzahlen in Transplantat und p.B. gebildet, jedoch nicht mit dem Korrekturfaktor multipliziert, d.h. es wurde kein CI gebildet. Auf diese Weise wurde der Einfluß des p.B. auf die Zusammensetzung der MNZ im Transplantat reduziert.

Nach Korrektur der Blutkontamination ändert sich die Zusammensetzung der MNZ im Transplantat kaum (Abb. 10). Lediglich bei den LGL kommt es zu einer Verschiebung: Nach Korrektur der Blutkontamination ist die Verteilung bei ZTR III und VI fast identisch. Das läßt vermuten, daß die vor der Korrektur bestehende unterschiedliche Verteilung bei VI und ZTR III auf einen höheren Anteil LGL im Blut von Virusinfizierten zurückzuführen ist.

3.2.3.2 Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl

Das Verhältnis LYSP/Gesamtlymphozyten gibt Aufschluß über qualitative Veränderungen innerhalb der Lymphozytenpopulation.

Abbildung 11 ist zu entnehmen, daß LB nur bei ZTR III im Transplantat vorkommen, allerdings nur in 6 von 18 FNAC. Deshalb ist der Unterschied zur VI nicht signifikant ($p < 0,2$). Der Anteil der ALy/LY beträgt im Median bei ZTR III 2,6 %, bei VI 1,5 %. Auch der Maximalwert liegt mit 14,4 % bei ZTR III gegenüber 10,9 % bei VI höher. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p < 0,1$). LGL machen bei VI bis zu 38 % der Lymphozyten im Transplantat aus (Median: 12,5 %), bei ZTR III maximal 17,8 % der Lymphozyten (Median: 5,9 %). Die Gruppen unterscheiden sich aber nicht signifikant ($p < 0,1$).

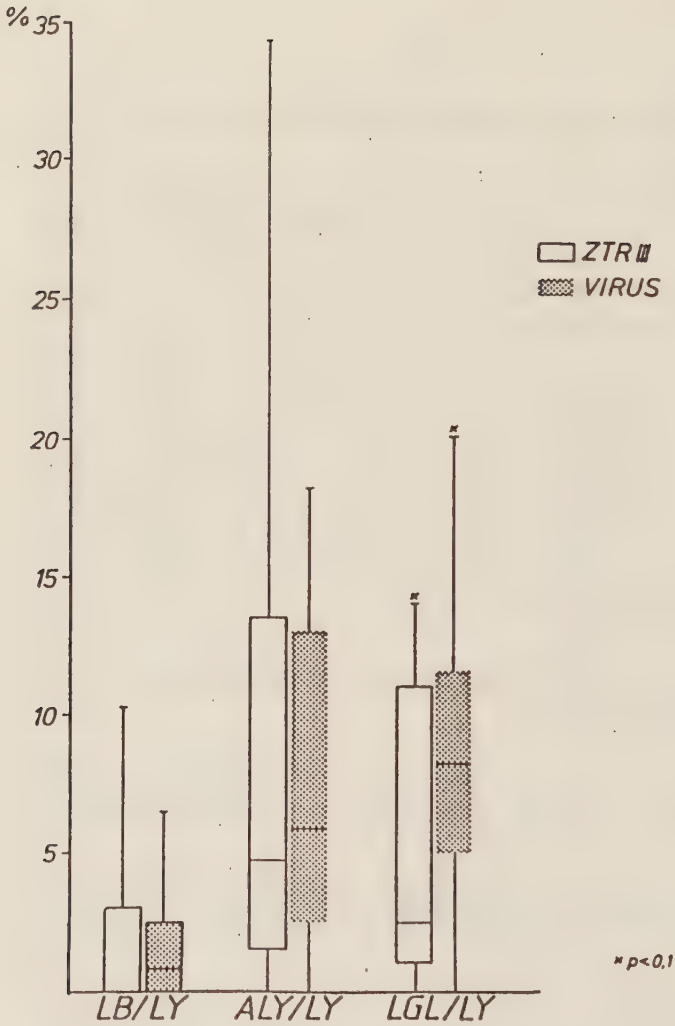


Abbildung 11: LYSP/Gesamtlymphozyten in der FNB
(STAT I)

3.2.4 Mononukleäre Zellen im peripheren Blut

Der prozentuale Anteil der LB und ALy zeigt im p.B. bei ZTR III und VI keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,1$) (Abb. 12). LGL sind dagegen tendentiell häufiger im p.B. von virusinfizierten Patienten zu finden. Bei VI machen sie maximal 16 % (Median: 4,15 %), bei ZTR III maximal 12 % (Median: 1 %) der MNZ des p.B. aus.

Lymphozyten und Monozyten kommen innerhalb jeder Gruppe in sehr unterschiedlicher Häufigkeit vor. ZTR III und VI unterscheiden sich in Bezug auf diese Zellarten nicht ($p < 0,2$).

3.2.4.1 Absolutzahlen mononukleärer Zellen

Absolutzahlen der LYSP/mm³ wurden, wie in 2.2.6 beschrieben, berechnet. Dadurch wurde eine eventuell bestehende Lymphozytose berücksichtigt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis.

Wie schon bei der prozentualen Verteilung unterscheiden sich VI und ZTR III in den Zellzahlen/mm³ für LB und ALy nicht ($p < 0,2$).

Der Unterschied in der Zahl der LGL/mm³ Blut ist deutlicher als bei der prozentualen Verteilung: Bei VI kommen maximal 843 LGL/mm³ vor, bei ZTR III maximal 305 LGL/mm³ (Mediane, VI 87/mm³, ZTR III 26/mm³). Diese höheren Absolutwerte für LGL/mm³ lassen sich auf eine bei VI bestehende relative Lymphozytose zurückführen.

3.2.4.2 Verhältnis der Lymphozytensubpopulationen zur Gesamtlymphozytenzahl

Abbildung 14 zeigt LYSP/LY. Durch die Bildung dieses Verhältnisses lassen sich selektive Zunahmen einzelner Subpopulationen gut demonstrieren.

ZTR III und VI unterscheiden sich im Anteil der LB und ALy an den Gesamtlymphozyten nicht ($p < 0,2$).

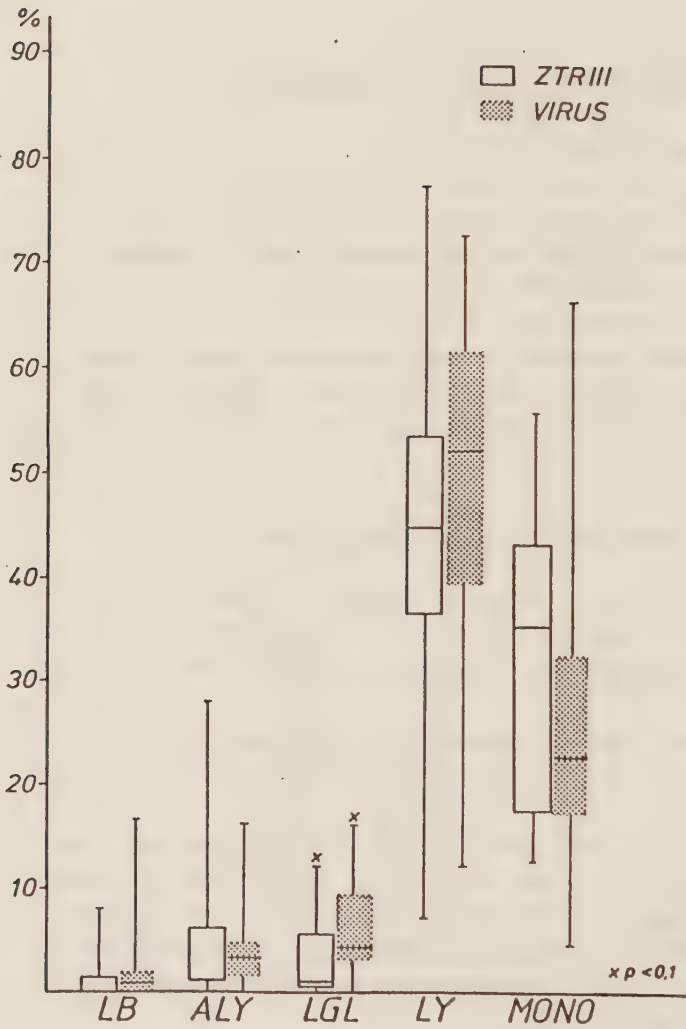


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der MNZ im p.B.
(STAT I)

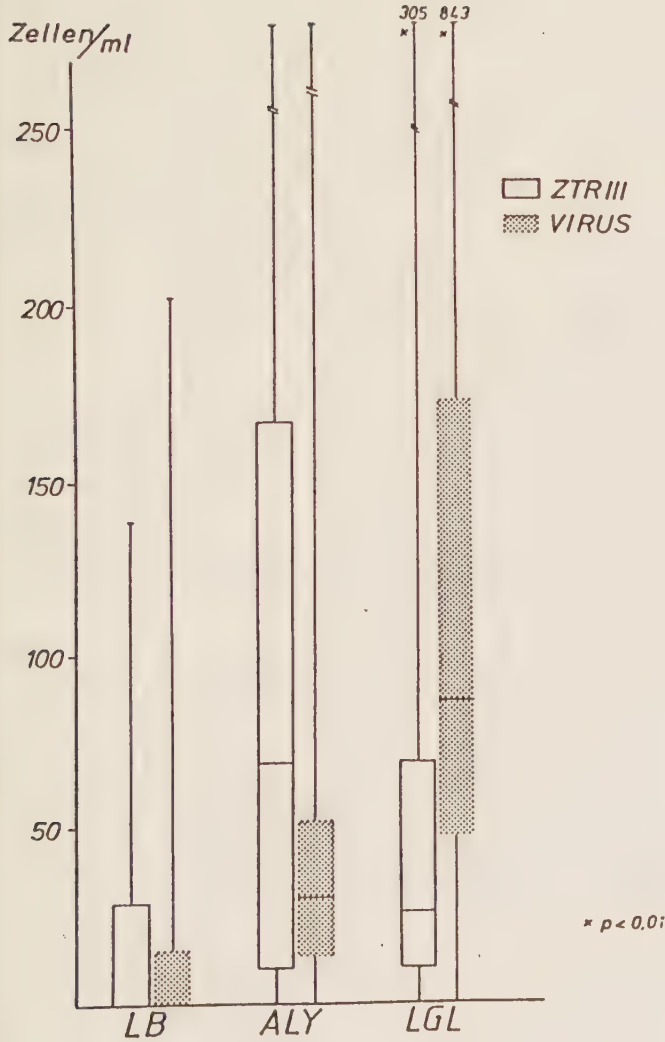


Abbildung 13: Absolutzahlen der LYSP im p.B.
(STAT I)

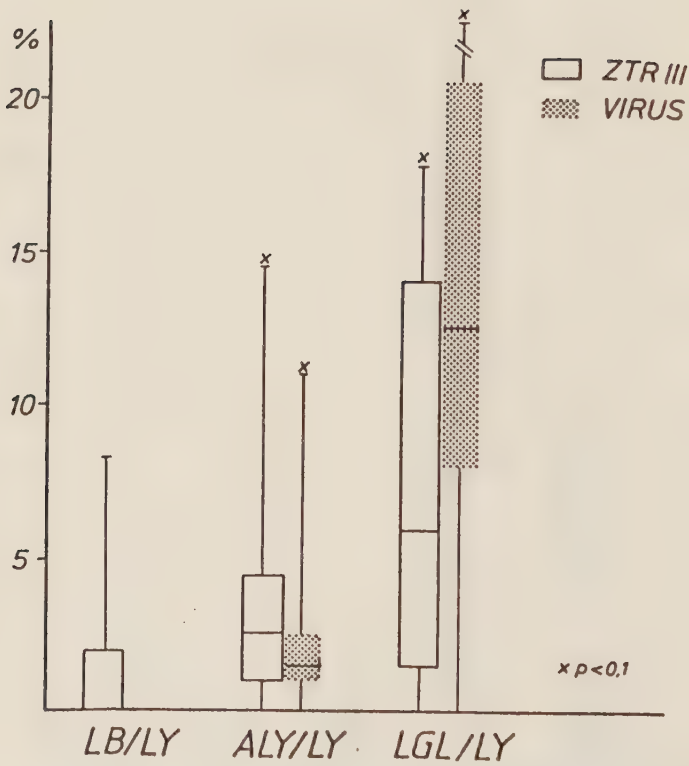


Abbildung 14: LYSP/Gesamtlymphozyten im p.B.
(STAT I)

LGL machen bei VI bis zu 20 % (Median: 8,2 %) der Lymphozyten des p.B. aus, dagegen bei ZTR III nur maximal 14 % (Median: 2,4 %) ($p < 0,1$).

Dieser höhere Anteil der LGL/LY weist darauf hin, daß neben der relativen Lymphozytose bei VI auch eine selektive Zunahme der LGL für den Anstieg dieser Zellen im p.B. verantwortlich ist.

3.3 Markierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes mit monoklonalen Antikörpern

Wie in 2.2.7 beschrieben wurden MNK aus dem p.B. zur immunologischen Unterscheidung der LYSP mit McAb markiert. Die verwendeten Primärantikörper sind unter 2.2.2.7 aufgeführt. Die Zellzahl der MNK war nicht immer ausreichend, um alle Primärantikörper bei jeder Untersuchung einzusetzen. Die verschiedenen Grade der ZTR und VI sind in gemeinsamen Abbildungen wiedergegeben.

3.3.1 T-Zellsubpopulationen bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion

152 MNK wurden mit folgenden McAb markiert:

- OKT 3 : Gesamt-T-Lymphozyten
- OKT 4 : Helper- und Inducer-T-Lymphozyten
- OKT 8 : Killer- und Suppressor-T-Lymphozyten

Die Verteilung auf die Gruppen ZTR I-III und VI war wie folgt:

- ZTR I : 82 MNK
- ZTR II : 37 MNK
- ZTR III: 15 MNK
- VI : 20 MNK

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis. T-Zellen kommen im p.B. aller 4 verglichenen Gruppen in ähnlich hoher Anzahl vor. Die Mittelwerte liegen zwischen 43 und 51 %.

T_h -Zellen sind bei allen Graden einer ZTR nahezu gleich häufig (Mittelwerte 35,5 - 38,5 %). Bei VI liegt die Anzahl der T_h -Zellen signifikant niedriger als bei ZTR ($p < 0,002$).

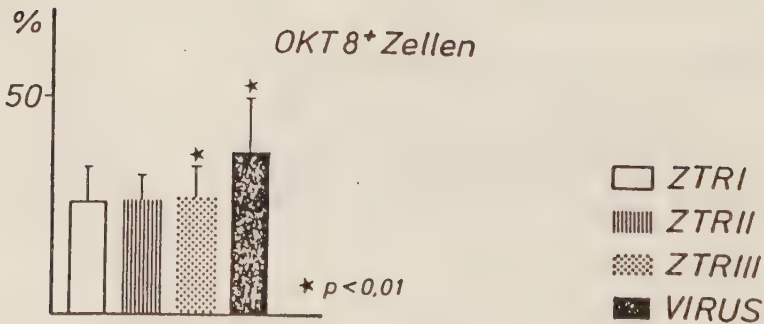
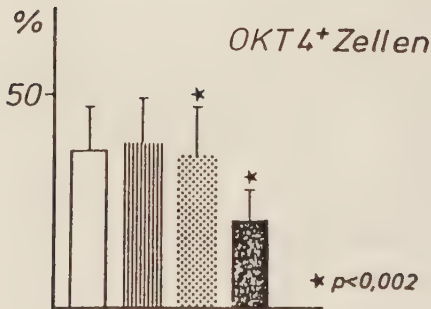
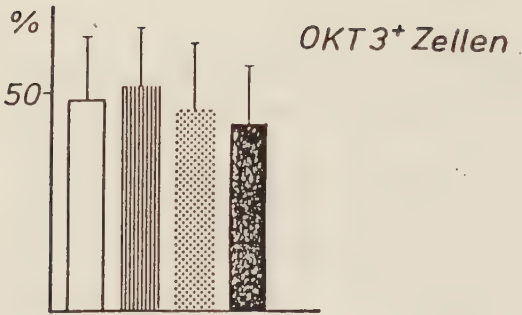


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung der T-Zellsubpopulationen im p.B. (STAT II)

Im Mittel enthält das periphere Blut bei VI 21 % Helfer-T-Lymphozyten.

$T_{k/s}$ -Zellen bilden in allen Gruppen der ZTR ungefähr 36 % der T-Lymphozyten (Mittelwert 25,5 - 27 %). VI sind dagegen durch im Mittel 37,5 % Killer/Suppressor-Zellen gekennzeichnet ($p < 0,01$).

In Tabelle 11 wurde das Verhältnis von T-Helfer- zu T-Killer/Suppressor-Zellen gebildet:

Tabelle 11: Verhältnis von T_h - zu $T_{s/k}$ -Lymphozyten im p.B. bei ZTR I-III und VI

	ZTR I	ZTR II	ZTR III	VI
Verhältnis T_h - zu $T_{s/k}$ -Zellen	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,3	0,65 $\pm$ 0,35

Das Verhältnis der Helfer-Lymphozyten zu den Killer/Suppressor-Lymphozyten war bei ZTR immer größer 1,4, bei VI dagegen immer kleiner 1, im Mittel 0,65.

3.3.2 Aktivierete Lymphozyten bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion

Bei 130 MNK wurden mit dem McAb OKT 10 ALy im p.B. markiert. Davon entfielen auf die Gruppe ZTR I 71, auf die Gruppe ZTR II 34, auf die Gruppe ZTR III 12 und auf die Gruppe VI 13 MNK. Abbildung 16 zeigt, daß ALy bei VI signifikant häufiger als bei ZTR I und II vorkamen (Mittelwerte, ZTR I: 3,4 %, ZTR II 3,6 %, VI 8 %, $p < 0,05$). Die Werte für OKT 10⁺ Zellen bei ZTR III lagen zwischen denen bei ZTR I/II und VI (Mittelwert: 5 %).

3.3.3 B-Lymphozyten bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion

149 MNK wurden mit dem McAb MOAK 5202 gegen B-Lymphozyten markiert. 77 MNK gehörten in die Gruppe ZTR I, 39 in die Gruppe ZTR II, 15 in die Gruppe ZTR III und 18 in die

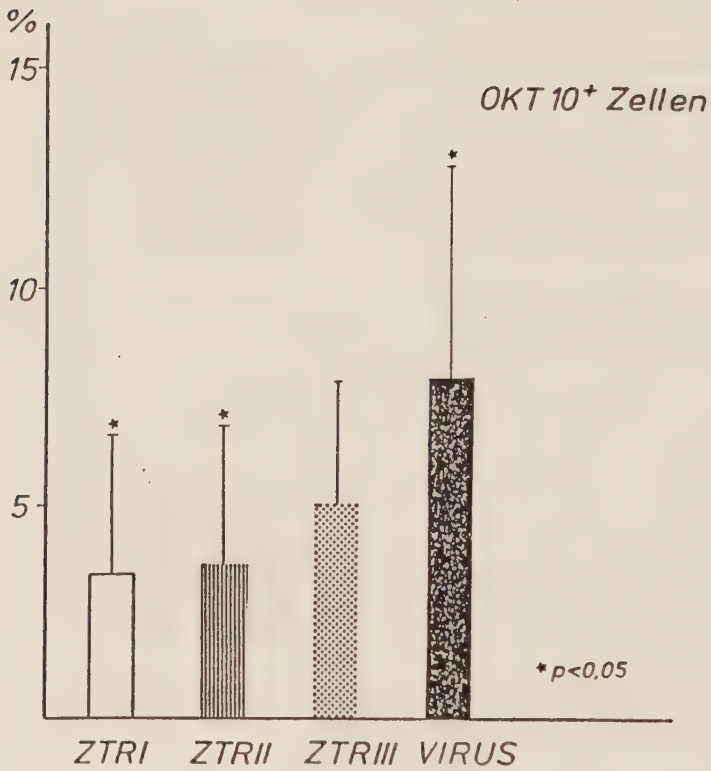


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der ALy im p.B.
(STAT II)

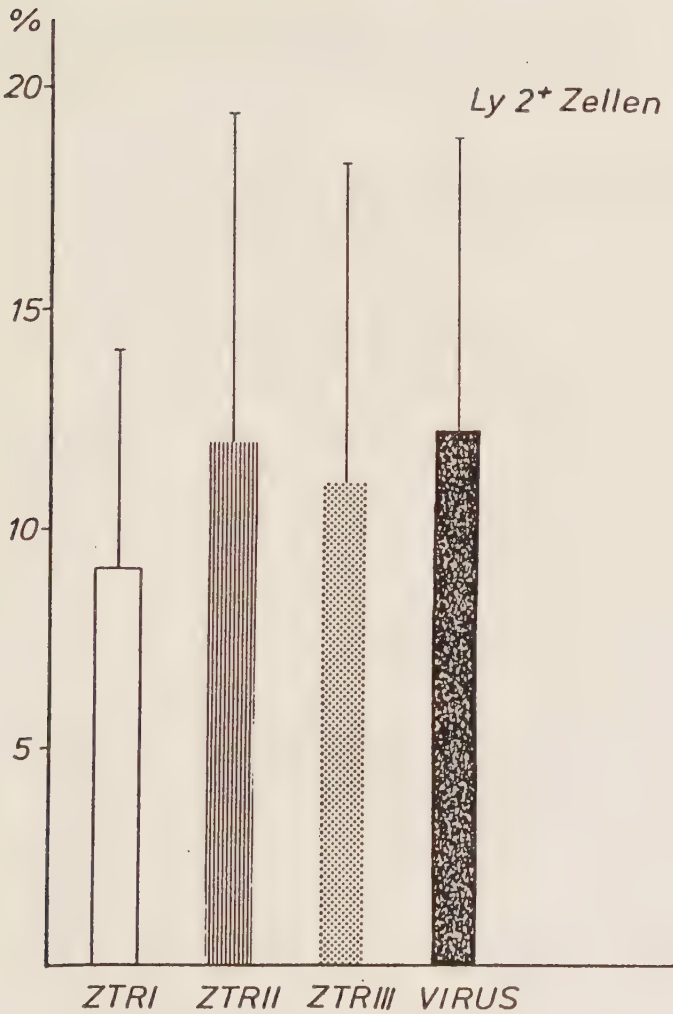


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der B-Lymphozyten im p.B. (STAT II)

Gruppe VI. Abbildung 17 ist zu entnehmen, daß die vier Gruppen sich in der Anzahl der B-Zellen nicht signifikant unterscheiden. Die Mittelwerte lagen zwischen 9,1 (ZTR I) und 12,3 % (VI).

3.3.4 DR-Antigen präsentierende Zellen bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion

110 MNK wurden mit dem McAb Ia75 gegen DR-Antigene der Zellmembranen markiert. 54 MNK entfielen auf die Gruppe ZTR I, 32 auf ZTR II, 12 auf ZTR III und 12 auf die Gruppe VI. Abbildung 18 zeigt, daß zwischen den 3 Gruppen der ZTR im Mittel kein Unterschied in der Anzahl der DR-Antigen präsentierender Zellen besteht. Es kommen 21 - 23,5 % Ia75⁺-Zellen vor. Bei VI war die Anzahl Ia75⁺-Zellen im p.B. zwar geringer (Mittelwert 17,1 %), unterschied sich jedoch nicht signifikant von den Werten bei ZTR.

3.4 Fallbeschreibung des Patienten K.H.

Der 34jährige Patient K.H. war aufgrund einer chronischen Glomerulonephritis terminal niereninsuffizient. Im Juli 1979 war eine erste Nierentransplantation durchgeführt worden. Am 3.9.1983 wurde dem Patienten zum zweiten Mal eine Kadaverniere transplantiert. Unter anfänglicher Immunsuppression nach dem Dreifachschemata mit CSA, AZA und MP (s. 2.7.1.2) kam es nie zu ausreichender Transplantatfunktion. Am 29. po Tag traten ein Temperaturanstieg über 40°C und eine Leukopenie auf. Unter der Vorstellung, daß es sich um einen VI handeln könnte, wurde die Immunsuppression vom 29. - 35. po Tag abgesetzt. Nach Besserung der Symptome kam es am 41. Tag nach Transplantation erneut zu Temperaturanstieg und Leukopenie. Am 44. po Tag konnte serologisch eine frische CMV-Infektion nachgewiesen werden. Es entwickelte sich ein schweres infektiöses Krankheitsbild mit zerebraler und pulmonaler Beteiligung. Unter Verzicht auf weitere Immunsuppression kam es zu einer irreversiblen Transplantatabstoßung. Am 60.

po Tag mußte das funktionslose Transplantat wegen lokaler Komplikationen entfernt werden.

In der Zeitspanne vom 19. - 57. Tag konnten von diesem Patienten 7 FNAC und 10 MNK ausgewertet werden. In den Abbildungen 19-21 sind das Increment der MNZ im Transplantat und im p.B., sowie die Anzahl der T_h - und $T_{s/k}$ -Zellen und das CI dargestellt.

Am 19. und 23. po Tag wurde eine ZTR I gefunden. Am 25. po Tag kam es zu einer vorwiegend lymphozytären ZTR II. Im p.B. zeigte sich keine Veränderung der MNZ. Am 30. po Tag hatte sich diese ZTR II zurückentwickelt, das CI war unter 3 gesunken. Am gleichen Tag kam es im p.B. zu einem relativen Anstieg der lymphozytären Zellen: LB, ALy und Lymphozyten traten vermehrt auf. Die Zahl der T_h -Zellen war stärker abgefallen als die der $T_{s/k}$ -Zellen. Klinisch bestanden Fieber und eine Leukopenie. Die Immunsuppression wurde abgeetzt. Am 35. po Tag bestand dieses Bild fort, die klinischen Symptome waren jedoch rückläufig.

Einen Tag später hatte sich im Transplantat nach Absetzen der Immunsuppression eine ZTR III (CI 12,4) entwickelt: LB, ALy, LGL und Lymphozyten beherrschten das zytologische Bild. Die immunsuppressive Therapie wurde wieder begonnen. Im p.B. stiegen die LB, ALy und Lymphozyten weiter an. Erstmals traten LGL auf. T_h - und $T_{s/k}$ -Zellen kamen nahezu gleich häufig vor.

Am 38. po Tag hatte die Transplantatinflammation weiter zugenommen. Im Blut wurde der Anteil der Blastzellen an den Lymphozyten größer. Eine Abstoßungstherapie wurde eingeleitet. Am 44. po Tag gelang serologisch die Diagnose einer frischen CMV-Infektion. Die Immunsuppression wurde abgesetzt.

Bereits um den 38. po Tag war es zu einer Umkehr des Verhältnisses der $T_h/T_{s/k}$ -Zellen gekommen, das bis zum 43. po Tag deutlich ausgeprägter wurde. Im Transplantat war die schwere ZTR am 43. po Tag rückläufig (CI 7,4): Als Folge der Abstoßungstherapie kamen LB nicht mehr vor, es bestand jedoch weiterhin eine Inflammation aus ALy, LGL und Lymphozyten.

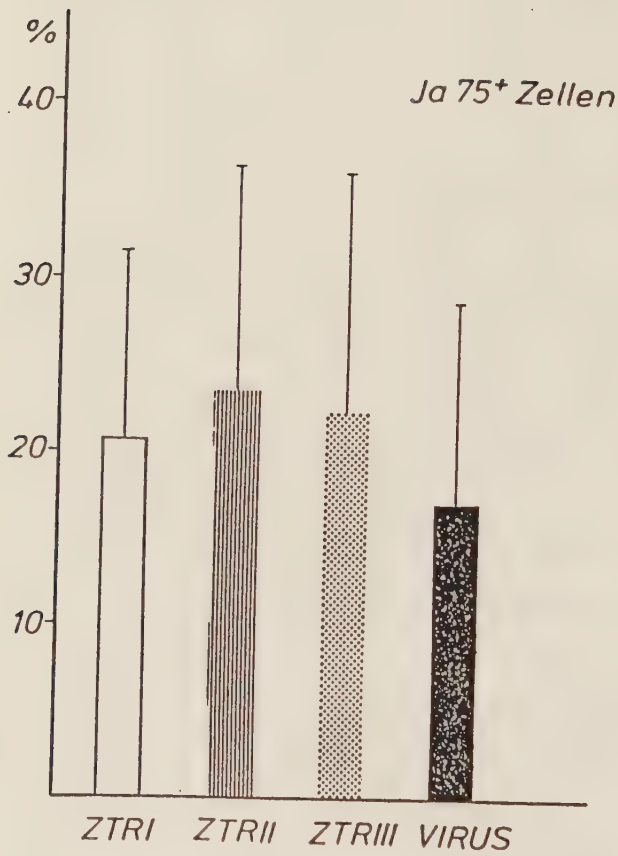


Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der DR-Antigen präsentierenden Zellen im p.B. (STAT II)

Im p. B. nahmen die LB und ALy ab ohne die Ausgangswerte zu erreichen. Die relative Lymphozytose nahm zu und die Zahl der LGL stieg weiter an. Die Umkehr des T_h -/ T_s/k -Zellverhältnis blieb bestehen. Der Patient hatte eine schwerste generalisierte CMV-Infektion.

Am 50. und 57. po Tag hatte sich an der Verteilung der MNZ im p.B. gegenüber dem 43. po Tag grundsätzlich nichts geändert. Die LGL waren weiter angestiegen.

Am 60. po Tag mußte das irreversibel abgestoßene Transplantat entfernt werden.

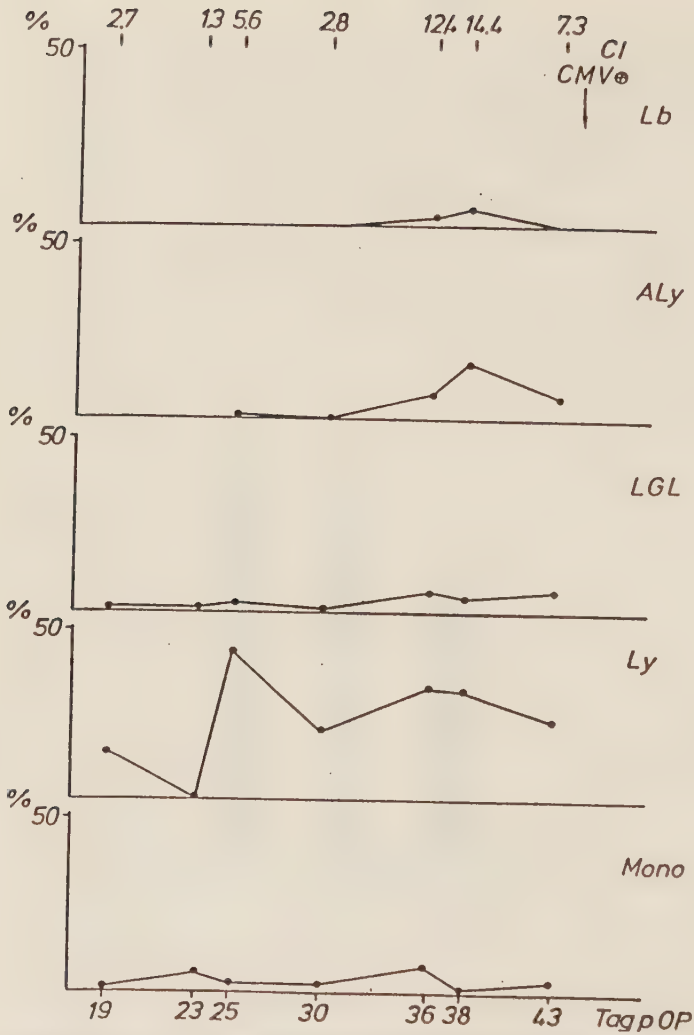


Abbildung 19: Verlaufsbeobachtung des Increment MNZ in der FNB

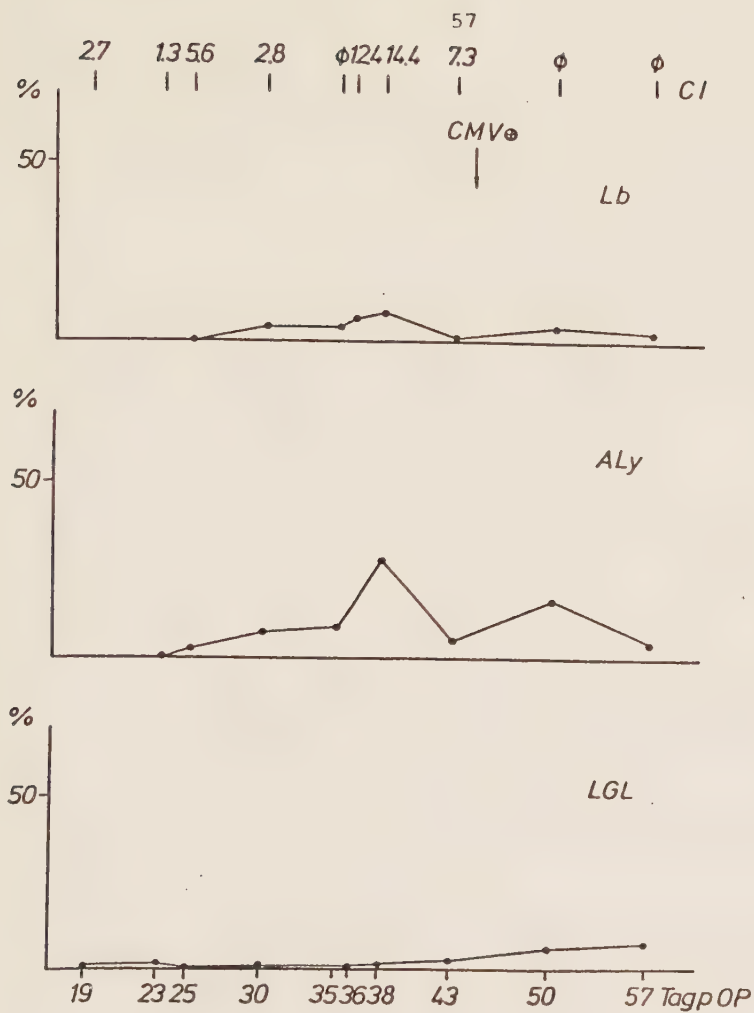


Abbildung 20 und 21: Verlaufsbeobachtung der MNZ und des T_4 - T_8 -Zellverhältnis im p.B.

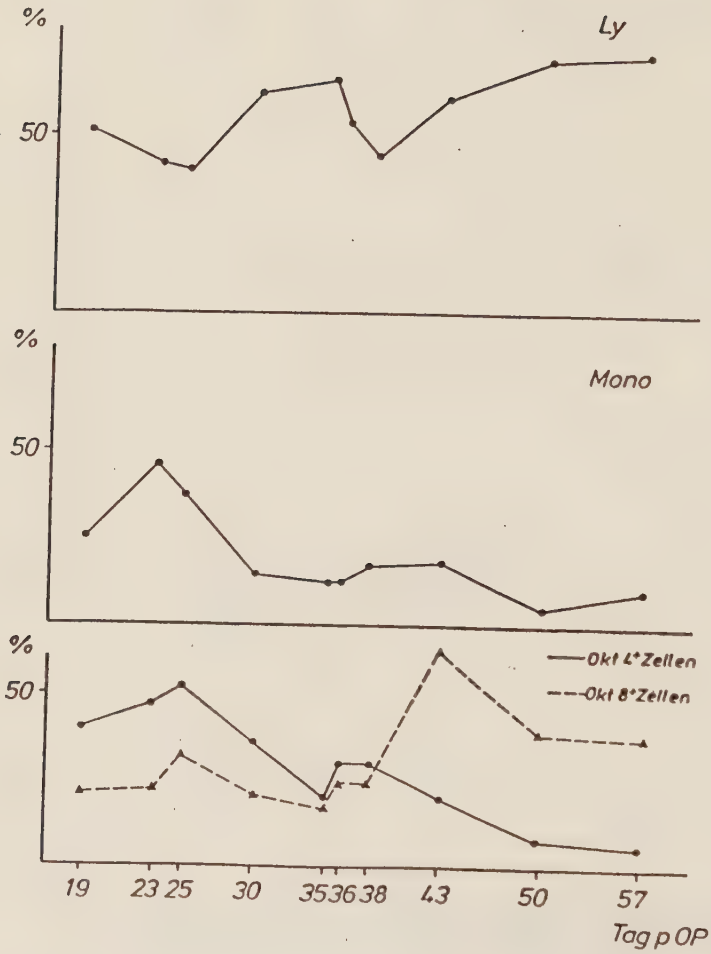


Abbildung 21

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 FNB

Zur Gewinnung MNZ aus dem Transplantat diente die FNB. Diese von A. PASTERNAK und P. HÄYRY eingeführte Methode wird seit Jahren erfolgreich am Klinikum Großhadern und im Institut für Chirurgische Forschung eingesetzt (58, 60, 136). Die FNB zeichnet sich aus durch:

- Einfache technische Durchführbarkeit (47, 136)
- Geringe Komplikationsrate (52)
- Nahezu beliebig häufige Wiederholbarkeit (52)
- Sehr gute Übereinstimmung mit histologischen Ergebnissen (29, 78, 79)
- Möglichkeit der zytologischen und immunologischen Differenzierung von Einzelzellen (62)

Bei über 1200 am Klinikum Großhadern durchgeführten FNB sind zwei Komplikationen bekannt: in einem Fall handelte es sich um eine Sepsis, die im Zusammenhang mit einer FNB gesehen wurde und im zweiten Fall um eine intrarenale Blutung nach FNB. P. HÄYRY beobachtete bei über 1300 FNB nur eine schwere Komplikation, eine Blasentamponade bei Makrohämaturie (52).

Die gute Reproduzierbarkeit von FNB-Ergebnissen konnte durch wiederholte Biopsien aus verschiedenen Polen des gleichen Transplantates bewiesen werden (63, 170).

Gleichzeitig durchgeführte Stanzbiopsien ergaben einen hohen Grad an Übereinstimmung zwischen histologischen und zytologischen Ergebnissen der FNB (29, 78, 79): Von 78 gleichzeitig durchgeführten FNB und Stanzbiopsien zeigten 87 % nahezu vollständige Übereinstimmung (78). Diese gute Korrelation gilt unter der Einschränkung, daß es sich um eine zelluläre AR handelt. Humorale Abstoßungsmechanismen können mit der FNB nicht direkt erfaßt werden, da sie vorwiegend das Gefäßsystem und die Glomeruli betreffen (95).

Zur Beurteilung der Qualität einer FNB wurde die Anzahl der Nierengewebszellen herangezogen. P. HÄYRY konnte zeigen, daß bei mehr als 7 Nierengewebszellen/100 Leukozyten wiederholte Aspirate aus dem gleichen Transplantat einen hohen Grad an Übereinstimmung zeigten (170).

Ein Problem bei der Interpretation der Inflammation stellt die unterschiedliche Kontamination der FNB durch aspiriertes Blut dar. Durch die Einführung des "Corrected Increment" konnte diese Kontamination rechnerisch eliminiert werden: Die Zellpopulationen werden in p.B. und FNB differenziert und durch Subtraktion der Werte des p.B. von denen der FNB wird die in situ Inflammation errechnet. Untersuchungen von P. HÄYRY et al. sprechen dafür, daß dieses Increment relativ genau die tatsächliche Inflammation wiedergibt (49, 52, 171). Im Gegensatz zur Stanzbiopsie werden bei der FNB Einzelzellen untersucht. Dadurch ist es möglich, infiltrierende Zellen mit zytologischen und immunologischen Methoden genau zu differenzieren, Funktionstests durchzuführen und so Aufschlüsse über den Pathomechanismus von Transplantatabstoßungen zu gewinnen.

Um methodische und individuelle Einflüsse bei der Auswertung der FNB so gering wie möglich zu halten, wurden von jedem Präparat verschiedene Bereiche von mindestens zwei Untersuchern ausgewertet.

Die FNB stellt eine geeignete und sichere Methode dar, um MNZ aus Transplantaten zu untersuchen und den Schweregrad einer ZTR zu beurteilen.

4.1.2 Mononukleäres Konzentrat

Aus 10 ml heparinisiertem Blut wurde die Gesamtleukozytenzahl bestimmt, ein Differentialblutbild angefertigt und das MNK isoliert. Differentialblutbild und Leukozytenzahl wurden in klinischen Labors kontrolliert.

Die Separation der MNZ erfolgte durch Zentrifugation über einen Ficoll-Hypaque Gradienten (14). Die MNZ - im allgemeinen Lymphozyten und Monozyten - sind im

Interphasering zwischen Ficoll-Hypaque Lösung und dem Gemisch aus Plasma und Hank'scher Lösung zu finden, die Erythrozyten und polymorphkernigen Leukozyten bilden den Bodensatz. Juvenile Zellen aus der myelotischen Reihe, Metamyelozyten und Promyelozyten, können aufgrund ihrer ähnlichen spezifischen Dichte in geringen Prozentzahlen auch im MNK beobachtet werden. Ebenso konnten sehr selten unreife Formen der erythropoetischen Reihe differenziert werden.

Um eine zur Auswertung optimale Zelldichte zu erreichen, sollte jedes Präparat nach Zytozentrifugation bei 10-facher Vergrößerung ungefärbt überprüft werden. Die Färbung nach Pappenheim ist unproblematisch und die MNZ lassen sich lichtmikroskopisch gut differenzieren.

Die Markierung von LYSP mit McAb ist eine experimentell wie klinisch etablierte Methode (127, 126, 128, 127, 154, 143, 125). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Obwohl nur jeweils 2x100 Zellen ausgezählt wurden, sind Ergebnisse vergleichbar, die mit einem "fluorescence activated cell sorter" erzielt wurden und denen wesentlich höhere ausgezählte Zellzahlen zu Grunde liegen (25).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Ficoll-Hypaque Zentrifugation eine schnelle und zuverlässige Methode zur Isolierung MNZ ist. Durch lichtmikroskopische Differenzierung und Markierung mit McAb können diese Zellen morphologisch und immunologisch genau differenziert werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse bei zellulärer Transplantatreaktion

Von 155 bei ZTR durchgeführten FNB konnten 145 ausgewertet werden. Zehn FNB mußten ausgeschlossen werden, da sie aufgrund zu weniger Nierengewebszellen nicht als repräsentativ bewertet werden konnten: Diese FNB enthielten weniger als 7 Nierengewebszellen (49, 170). Die Quote der Bewertbarkeit von 92 % verdeutlicht die Zuverlässigkeit und Aussagekraft der FNB.

Zu 144 der 145 bewertbaren FNB konnte das MNK aus dem p.B. isoliert werden: In einem Fall gelang die Ficoll-Hypaque Zentrifugation wegen der Verunreinigung der Lösung nicht. FNB wurden bei Patienten zwischen dem 2. und 281. po Tag durchgeführt. 119 der 155 FNB fanden im 1. Monat nach Transplantation statt, also in dem Zeitraum, in dem erfahrungsgemäß das Risiko einer akuten zellulären AR am größten ist (49, 4). In 36 Fällen wurde später als im 1. po Monat biopsiert. Diese Patienten waren meistens von der Transplantationseinheit entlassen und befanden sich in ambulanter Nachsorge. Indikation zur FNB war in diesen Fällen eine Verschlechterung der Transplantatfunktion (Diureserückgang, Serumkreatininanstieg).

Die Anzahl der FNB/Patient variierte von 1-9. Diese Zahl stieg bei Komplikationen wie verzögerter Funktionsaufnahme des Transplantates, Abstoßungsreaktionen oder sekundärem Funktionsverlust des Transplantates und dadurch bedingtem längerem stationärem Aufenthalt an. Die 16 Patienten von denen nur eine FNB vorliegt, waren meist primär nicht in die Studie aufgenommen und wurden später wegen diagnostischer Fragestellungen nur ein einziges Mal biopsiert. Für ein lückenloses Monitoring nach Nierentransplantation sollte die FNB allerdings, wie es die finnische Arbeitsgruppe um P. HÄYRY praktiziert, routinemäßig alle 2 - 3 Tage, wenn nötig auch täglich, durchgeführt werden (52).

Um den Schweregrad der ZTR zu erfassen wurde das CI errechnet. Nach dieser von P. HÄYRY et al. entwickelten Methode wird jede aspirierte Zellart gemäß ihrer vermuteten immunologischen Potenz gewichtet (48, 51, 52, 59, 171, 172). Der als Ergebnis erhaltene Zahlenwert stellt ein Maß für die Aggressivität des gesamten Zellinfiltrates im Transplantat dar, sagt jedoch nichts über dessen Zusammensetzung aus. In dieser Studie wurden anhand des CI 3 Gruppen gebildet, deren Einteilung aufgrund der Erfahrungen am Institut für Chirurgische Forschung erfolgte (136, 150).

Die Gruppe ZTR I mit CI-Werten von 0-3 umfaßt Transplantate, die entweder kein zelluläres Infiltrat zeigen oder eine beginnende zelluläre Reaktion aufweisen oder bei denen sich eine höhergradige ZTR in Rückbildung befindet. Zu dieser Gruppe gehören auch einige Transplantate, die bei mehreren FNB in Folge eine lymphozytäre ZTR aufwiesen. Alle diese Patienten standen unter CSA Therapie. Ähnliche zelluläre Infiltrate, die schwer von schwachen AR zu unterscheiden sind, wurden wiederholt beschrieben (77, 91, 147). Um in solchen Fällen zwischen beginnender AR und CSA-Nephrotoxizität differenzieren zu können, müssen Klinik, CSA-Serumspiegel sowie Morphologie und Anzahl der Nierengewebszellen zur Auswertung herangezogen werden (164, 166, 169).

Die Gruppe ZTR II mit CI-Werten zwischen 3 und 6 zeigt mittelgradige zelluläre Infiltrate. Es handelt sich dabei um FNB mit moderater AR, sich zurückbildender AR oder um FNB unter wirksamer Abstoßungstherapie.

Zur Gruppe ZTR III mit CI-Werten über 6 zählen FNB mit massivem zellulärem Infiltrat als Ausdruck einer schweren akuten AR. Diese AR waren teilweise irreversibel.

4.2.1 Mononukleäre Zellen im Transplantat

Im Transplantat kommt es bei zunehmendem Schweregrad einer ZTR nicht nur zu einem Anstieg der absoluten Zellzahlen, sondern auch zu einer Veränderung der qualitativen Zusammensetzung des Infiltrates.

Ohne Korrektur der Kontamination durch das p.B. ist die FNAC bei ZTR I durch ein geringes lympho-monozytäres Zellinfiltrat sowie das nahezu vollständige Fehlen von Blastzellen und LGL gekennzeichnet. Diese Beobachtungen stimmen überein mit denen von BURDICK et al., die bei Stanzbiopsien auch ohne Anhalt für eine AR inhomogene mononukleäre Infiltrate fanden (18). Auch von P. HÄYRY's Gruppe sind ähnliche Befunde beschrieben (52). Diese geringe Transplantatreaktion bei gut funktionierendem Transplantat könnte mit der CSA-Immunsuppression in

Zusammenhang stehen, die alle untersuchten Patienten erhielten. Unter dieser Therapie ist eine geringe lympho-monozytäre Inflammation bekannt, die Wochen bis Monate bestehen kann, ohne die Transplantatfunktion zu beeinträchtigen (49, 77, 147). Wird bei diesen Patienten CSA abgesetzt, kann es nach Berichten von P. HÄYRY sehr schnell zu einem Blastenschub kommen (49). Die Korrektur der Blutkontamination zeigt, daß auch bei der mit 25 % des HZV durchbluteten Niere das p.B. keinen großen Einfluß auf die Zusammensetzung der inflammatorischen Zellen in der FNAC hat. In keiner der untersuchten Gruppen verändert sich die qualitative Zusammensetzung der Inflammation. Die Werte für die einzelnen Zellpopulationen liegen zwar prozentual niedriger, das Verhältnis zueinander bleibt jedoch gleich. Daraus kann geschlossen werden, daß mit der FNB tatsächlich in situ Verhältnisse erfaßt werden.

Der Anteil der Blastzellen an der Gesamtzahl infiltrierender Lymphozyten ist bei ZTR I zu vernachlässigen. LGL/Gesamtlymphozyten sind in Transplantat und p.B. gleich häufig, so daß keine spezifische Einwanderung von LGL in die Niere besteht. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigen, daß es bei gut funktionierendem Transplantat nicht zu einer Infiltration von LGL kommt (165).

Eine ZTR II - moderate oder unter Therapie abklingende ZTR - unterscheidet sich von der ZTR I im wesentlichen durch eine starke Zunahme der lymphozytären und monozytären Inflammation. ALy, die Vorstufen der LB, sind vermehrt im Transplantat zu finden, machen aber durchschnittlich nur 1,3 % der Lymphozyten aus. In diesem Stadium der ZTR werden noch keine LB beobachtet. LGL in situ steigen gegenüber ZTR I deutlich an. Ihr Anteil an den inflammatorischen Gesamtlymphozyten bleibt jedoch nahezu unverändert.

Bei ZTR III, gleichzusetzen der schweren zellulären AR, erreicht die lympho-monozytäre Inflammation ein Maximum: durchschnittlich finden sich 35 % Lymphozyten und 11 % Monozyten im Transplantat (Incrementwerte). ALy und LGL sind gegenüber der ZTR II weiter angestiegen. In diesem

Stadium treten typischerweise LB im Aspirat auf. Makrophagen, die als spezifisch für eine späte, irreversible AR gelten, konnten bei CSA-immunsupprimierten Patienten dieser Studie nur vereinzelt gefunden werden (95, 167). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen: P. HÄYRY et al. konnten an transplantierten, unbehandelten Rattennieren zeigen, daß bereits 2 - 3 Tage nach Transplantation eine lympho-monozytäre Infiltration stattfindet, die der beschriebenen ZTR II entspricht. Weitere 2 Tage später traten Blastzellen auf, entsprechend ZTR III (51).

STROM et al. fanden in irreversibel abgestoßenen Nieren ein im wesentlichen aus Lymphozyten (75 - 90 %) und Makrophagen (1 - 10 %) bestehendes Infiltrat (154).

In während AR durchgeführten Stanzbiopsien konnten VAN ES et al. mit McAb ebenfalls Lymphozyten (50 - 90 %) und Monozyten (10 - 20 %) als wichtigste inflammatorische Zellen nachweisen (35). Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellpopulationen zeigte in diesen Untersuchungen ähnlich große individuelle Schwankungen wie in unserer Studie.

Es kann als gesichert gelten, daß es sich bei dem größten Teil diese Lymphozyten um T-Zellen handelt, von denen die meisten phänotypisch T-Supressor/Killer-Zellen sind (35, 51, 61, 64, 133, 171).

Die Bedeutung der LGL ist noch nicht völlig aufgeklärt. Diese Zellen, mikroskopisch große, blasse Lymphozyten mit azurophilen Granula, sind nicht adhärent, nicht phagozytierend, Fc-Rezeptor positiv und synthetisieren keine Immunglobuline (70, 73). Ihnen wird die NK-Aktivität zugeschrieben (42, 73, 156, 157). In dieser Studie steigen die LGL von durchschnittlich 0,5 % (ZTR I) auf 2,5 % (ZTR III) an. Es fällt jedoch auf, daß die LGL/LY nicht signifikant mit dem Schweregrad der ZTR zunehmen. Dies könnte ein Anhalt dafür sein, daß die LGL im Rahmen einer lymphozytären Infiltration mitreagieren und nicht selbst eine spezifische Funktion bei AR haben. Anfängliche Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit geringeren FNB-Zahlen,

in denen eine Zunahme der LGL im Transplantat, als auch ihres Anteils an den Gesamtlymphozyten beschrieben wurde, stehen dazu im Widerspruch (165).

NEMLANDER et al. fanden, daß LGL zu den ersten das Transplantat infiltrierenden Zellen gehören am 2. - 4. Tag ein Maximum von 10 % der inflammatorischen Zellen erreichen, und dann schnell abnehmen. Parallel dazu verhält sich die NK-Aktivität (106, 107). HEIDECHE et al. konnte an Herztransplantaten bei der Ratte keinen Beweis dafür finden, daß NK-Zellen im Abstoßungsmechanismus eine wichtige Aufgabe hätten (65).

Um die genaue Rolle der LGL bei Transplantatabstoßung zu erforschen, sind weitere Studien notwendig, in denen diese Zellen morphologisch, immunologisch und funktionell untersucht werden.

4.2.2 Mononukleäre Zellen im peripheren Blut

Mit Hilfe der FNAC kann die zelluläre Inflammation im Transplantat genau erfaßt werden. Die Zusammensetzung des mononukleären Infiltrates gibt Aufschluß über den Schweregrad einer ZTR und kann als Therapierichtlinie mitherangezogen werden (s. 4.2.1).

MNZ, die bei ZTR in die Niere einwandern, kommen auch im p.B. des Empfängers vor, und es stellt sich die Frage, ob eine zu der Transplantatinflammation parallele oder vorangehende Reaktion auch im p.B. beobachtet werden kann? Es konnte von REITAMO et al. gezeigt werden, daß zelluläre Infiltrate der Niere nicht diffus sind, sondern T-Lymphozyten bevorzugt perivaskulär und Monozyten interstitiell zu finden sind (132). VAN ES et al. fanden darüber hinaus eine hohe Korrelation zwischen den perivaskulären T-Zellsubpopulationen und denen des p.B., was nahelegt, daß diese Lymphozyten aus dem Gefäß auswandern (35).

Nach allogener und xenogener Herztransplantation am Hund konnten bereits mehrere Tage bevor das Tier an einer akuten AR starb, im MNK des p.B. vermehrt ALy und LB beobachtet

werden (33, 122). Auch nach Herztransplantationen am Menschen fanden sich 1 - 3 Tage vor histologisch gesicherter AR ALy und LB vermehrt im p.B. (123). Es gibt Untersuchungen nach denen diese Lymphozyten im Transplantat aktiviert werden und in das Blut rezirkulieren (80, 120). Tägliche Differenzierung der MNZ im p.B. ermöglicht ein zyto-immunologisches Monitoring (ZIM) zur frühen Diagnostik von AR nach Herztransplantation (123, 124).

In dieser Studie konnten Veränderungen in der Zusammensetzung der MNZ des p.B. vor oder parallel zur zellulären Infiltration der Transplantatniere nicht gefunden werden.

Der deutliche Anstieg der Lymphozyten in der FNAC kann im MNK nicht beobachtet werden: Lymphozyten bilden konstant 42 - 45 % der MNZ. Ebenso ändert sich der Anteil der Monozyten im p.B. nicht (35 - 40 %), obwohl diese Zellen im Transplantat zunehmen. LB und ALy, die in der FNAC vermehrt bei schwerer ZTR III auftreten, zeigen im MNK nur eine tendentielle, Zunahme bei ZTR III. Ein typisches Ansteigen dieser Zellen vor AR, wie bei Herztransplantationen beschrieben, kann nicht festgestellt werden (123). Der Anteil der LGL, die bei ZTR III prozentual im Transplantat ansteigen, ist im p.B. immer gleich niedrig (1 - 1,5 %). Auch ELLIS et al., die im p.B. die NK-Zellaktivität, die den LGL zugeschrieben wird, untersuchten, fanden keinen Zusammenhang mit AR (31).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß ein Monitoring der MNZ im p.B. zur Diagnostik von AR nach Nierentransplantation nicht sinnvoll erscheint. Eine mögliche Rezirkulation im Transplantat aktivierter Zellen ins Blut konnte mit unserer Methodik nicht festgestellt werden. Ein Ausstrom immunkompetenter Zellen aus dem Transplantat wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen. Während AR konnten Blastzellen und phagozytierende Zellen im Lymphsystem, durch welches das Transplantat drainiert wurde gefunden werden (55, 89, 113). HÄYRY's Arbeitsgruppe beobachtete an unbehandelten Nierentransplantaten bei der Ratte einen Ein- und Austrom

immunkompetenter Zellen während AR, der bis zum 4. Tag zu- und dann schnell abnahm. Danach proliferierten die inflammatorischen MNZ im Transplantat nahezu unabhängig von neu einwandernden Zellen (104, 105).

ASCHER et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen: Die Proliferation zytotoxischer Zellen war nur bis zum 5. po Tag empfängerabhängig, danach war kein Ein- oder Ausstrom immunkompetenter Zellen zur Aufrechterhaltung der AR mehr notwendig (5).

Es wäre demnach denkbar, daß im p.B. nach Nierentransplantation mit der angewandten Methodik keine aktivierten Zellen gefunden wurden, weil das immunologische Geschehen ab einem bestimmten Zeitpunkt, im Transplantat unabhängig vom "zentralen Immunsystem" stattfindet. Zu dem frühen Zeitpunkt, zu dem nach den genannten tierexperimentellen Untersuchungen immunkompetente Zellen ins Transplantat einwandern, wurden in dieser Studie zu wenige FNB durchgeführt.

4.2.3 Vergleich der FNB und des mononukleären Konzentrationes von Transplantaten mit und ohne Blasten

Blastzellen gelten als typisch für die massive zelluläre AR. Darauf basierend wurden die FNAC in zwei Gruppen, mit und ohne Blastzellen, eingeteilt und die MNK entsprechend zugeordnet. Diese Aufteilung machte eine vom errechneten Wert des CI unabhängige Auswertung der Zellen im Transplantat und im p.B. möglich.

In FNB mit Blastzellen wurden LGL ($p < 0,001$) und Lymphozyten ($p < 0,025$) signifikant vermehrt gegenüber FNB ohne Blastzellen beobachtet. Monozyten kamen nur geringfügig vor. Dieses Ergebnis bestätigt, daß Blastzellen, LGL und Lymphozyten, die für die schwere akute AR verantwortlichen Zellen sind. Monozyten scheinen zum Zeitpunkt der Blastogenese noch keine wichtige Rolle zu spielen (34, 51, 154).

Die MNK des p.B. zeigen für keine der untersuchten Zellpopulationen signifikante Unterschiede. Wie bei ZTR III

kamen LB, LGL, und ALy nur tendentiell vermehrt in MNK zu FNB mit Blastzellen vor. Daraus kann, analog der Diskussion in 4.2.2 geschlossen werden, daß eine Inflammation im Transplantat keine Veränderung der MNZ im p.B. mit sich bringt und ein Monitoring dieser Zellen keine Aussage über Vorgänge mit Transplantat ermöglicht.

4.3 Diskussion der Ergebnisse bei Virusinfektion und schwerer zellulärer Transplantatreaktion

AR und VI sind die häufigsten Komplikationen nach Organtransplantationen (15, 44). In den ersten beiden Monaten nach Transplantation wurden in dieser Studie 7 von 9 CMV-Infektionen diagnostiziert. Die Differentialdiagnose zur akuten AR, die im gleichen Zeitraum pOp ihre größte Inzidenz hat, ist klinisch oft schwierig, wegen der unterschiedlichen Therapiekonsequenzen aber von großer Bedeutung (100). Aus diesem Grund galt unser besonderes Interesse der VI und der ZTR III.

Immunsupprimierte Patienten sind besonders durch Viren der Herpesgruppe gefährdet, am häufigsten durch CMV-Infektionen (44, 81, 101). Die Infektion kann auf zwei unterschiedlichen Wegen zustande kommen: Patienten, die vor Transplantation seronegativ für CMV waren, können primär mit dem Virus infiziert werden. Ein möglicher Mechanismus für diese primäre CMV-Infektion besteht in der Übertragung des Virus durch ein latent infiziertes Transplantat (57, 68). Bei Patienten, die bereits vor Transplantation Antikörper gegen CMV im Serum hatten, kann unter Immunsuppression die latente CMV-Infektion reaktiviert werden (71, 81, 92). Primäre Infektionen werden in der Regel in den ersten beiden Monaten nach Transplantation beobachtet. Klinische Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Leukopenie, Transaminasenanstiege und pulmonale Beteiligung sind in hohem Prozentsatz zu finden. Letale Ausgänge werden vor allem bei Superinfektionen beobachtet. Reaktivierungen latenter Virusinfektionen zeigen die Tendenz, erst mehrere Monate

nach Transplantation aufzutreten. Sie sind klinisch oft asymptomatisch und meist nicht therapiebedürftig (9, 81). Die Inzidenz von Virusinfektionen scheint unter Immunsuppression mit CSA geringer zu sein, als unter AZA (81, 115). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der VI und der immunsuppressiven Therapie: Schwere Verläufe und letale Ausgänge wurden vermehrt bei hochdosierter Immunsuppression beobachtet; besonders die Anwendung von ATG führt zu schwersten Infektionen (81, 40, 163, 115, 141).

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern waren in dieser Studie CMV-Infektionen die häufigsten und klinisch gravierendsten viralen Erkrankungen nach Transplantation (9, 81, 101, 115). Von 12 VI waren 9 CMV-Infektionen, davon 5 primäre Infektionen, die im 2. po Monat auftraten. Letale Verläufe kamen nicht vor, bei einem Patienten mußte jedoch nach Absetzen der Immunsuppression das Transplantat aufgegeben werden (s. Verlaufsbeschreibung). Die 2 beobachteten HSV-Infektionen waren Reaktivierungen latenter Infektionen und zeigten klinisch lediglich Haut- und Schleimhautsymptome. Die einzige EBV-Infektion war eine Reaktivierung unter Immunsuppression im 10. po Monat. Es traten extrem erhöhte Anti-EBV-IgG-Titer im Serum auf (1:16000), außer einem vorübergehenden Transaminasenanstieg konnten aber keine klinischen Symptome festgestellt werden.

4.3.1 Vergleich mononukleärer Zellen im Transplantat

Die Zusammensetzung der mononukleären Inflammation wurde bereits in 4.2.1 diskutiert. Da von 5 Patienten mit nachgewiesener VI nur 7 FNAC differenziert werden konnten, sind diese Ergebnisse nur mit Einschränkung zu werten.

In 3 der 7 FNAC war die VI von einer schweren ZTR III begleitet, in 2 Fällen wurde eine ZTR II diagnostiziert. Es fällt auf, daß es sich bei diesen 5 FNAC um Patienten mit primärer CMV-Infektion handelte. Eine CMV-Reaktivierung war nicht von einer ZTR begleitet und auch die einzige FNB von einem Patienten mit HSV-Reaktivierung zeigte kein

zelluläres Infiltrat. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung der primären CMV-Infektion nach Nierentransplantation (96, 141). Die Zusammensetzung des mononukleären Infiltrates weist bei VI gegenüber ZTR III nur einige tendentielle Unterschiede auf. Monozyten, die bei schwerer ZTR vermehrt ins Transplantat einwandern, waren bei VI nicht häufiger zu finden als bei ZTR I (35, 51, 154). Die lymphozytäre Inflammation unterschied sich bei VI und ZTR III nicht. STADLER fand bei VI im Vergleich zur AR sogar höhere Lymphozytenwerte im Transplantat, die zu 80 % aus T-Lymphozyten bestanden (149). Die Frage, ob diese Lymphozyteninflammation ein Hinweis auf eine gleichzeitig zur VI ablaufende AR darstellt, konnte wegen der geringen Fall- und Biopsiezahl nicht beantwortet werden. LB, die bei ZTR III vermehrt im Transplantat zu finden waren, konnten bei den untersuchten VI allerdings nicht beobachtet werden und auch der Anteil der ALy war bei VI niedriger.

Während VI ist der Prozentsatz der LGL im Transplantat von dem Vorkommen dieser Zellen im p.B. abhängig. Ohne Korrektur der Blutkontamination sind LGL im Median bei VI gegenüber ZTR III vermehrt, nach Korrektur besteht kein Unterschied mehr. Frühere Untersuchungen bestätigen, daß während VI LGL in FNAC und p.B. auf ungefähr gleich hohe Werte ansteigen, so daß sich kein Increment errechnet (165). Auch die Berechnung der LGL/Gesamtlymphozyten im Transplantat zeigt keine spezifische Infiltration dieser Zellen.

Mit wegen der geringen Fallzahl gebotener Vorsicht kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, daß Veränderungen der MNZ im Transplantat allein die Differentialdiagnose einer VI oder AR nicht zulassen.

4.3.2 Vergleich mononukleärer Zellen im peripheren Blut

Blastzellen, Lymphozyten und Monozyten sind im MNK bei VI und ZTR III nahezu gleich verteilt. Auch die Berechnung der LB/mm^3 und der ALy/mm^3 , sowie der prozentuale Anteil dieser

zellen an den Gesamtlymphozyten zeigt keinen Unterschied zwischen ZTR III und VI.

Im Gegensatz dazu sind LGL während VI häufiger im MNK zu finden als bei ZTR III. Ebenso ist ihr Anteil an den Gesamtlymphozyten bei VI gesteigert. Am deutlichsten wird der Unterschied bei der Berechnung der LGL/mm^3 Blut, da in diesem Fall die relative Lymphozytose der VI miteingeht (94).

LGL, die "Natural Killer" Aktivität besitzen, sind offensichtlich an der Abwehr von VI beteiligt (42, 73, 157, 158). So konnte gezeigt werden, daß Zellen mit NK-Aktivität zytotoxisch für Zellen sind, die EBV-, HSV- oder CMV-Antigene tragen (67, 96, 117, 139). NK-Aktivität gegen CMV-infizierte Fibroblasten konnte auch im Blut von Normalpersonen demonstriert werden, die keine Antikörper gegen CMV besaßen (75). Neben der NK-Zytotoxizität fanden mehrere Untersucher eine HLA-abhängige, spezifisch gegen CMV-infizierte Zellen gerichtete Zytotoxizität, deren Effektorzellen T-Lymphozyten sind und die nur bei Personen mit Antikörpern gegen CMV auftrat (43, 75). Demzufolge existieren 2 zelluläre Abwehrmechanismen gegen CMV- und eine Reihe anderer Virusinfektionen (32, 96): Bei nicht immunisierten Personen sind dies NK-Zellen, bei immunisierten Personen NK-Zellen und antikörperabhängige Killerzellen. Möglicherweise liegt darin eine Erklärung für den unterschiedlichen Schweregrad primärer CMV-Infektionen und der Reaktivierung latenter Infektionen. QUINNAN et al. konnten allerdings keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem Antikörper-Status vor Transplantation und dem Ausgang von CMV-Infektionen bei Knochenmarksempfängern feststellen (117).

LGL-Zahlen und NK-Aktivität werden durch verschiedene immunsuppressive Medikamente in unterschiedlichem Maße herabgesetzt. AZA allein oder in Kombination mit Corticosteroiden hat den größten Einfluß, Corticosteroide allein zeigen keinen Effekt. CSA scheint die NK-Aktivität nur gering oder gar nicht herabzusetzen (42, 121, 119, 116, 28, 160, 135). Bei Patienten nach

Knochenmarks- und nach Nierentransplantation ist der klinische Verlauf von CMV-Infektionen ganz entscheidend davon abhängig, ob die NK-Aktivität dieser Patienten zu Beginn der VI ansteigt. Tödliche Infektionen wurden nur beobachtet, wenn die supprimierte NK-Aktivität nicht zunahm. Allerdings ist zur erfolgreichen Abwehr einer CMV-Infektion zusätzlich nötig, daß innerhalb weniger Tage eine meßbare Zytotoxizität durch HLA-abhängige T-Lymphozyten entsteht und im Serum CMV-Antikörper auftreten (23, 117, 118, 137). Der bei den Patienten dieser Studie beobachtete Anstieg der LGL im MNK und die Tatsache, daß nur eine einzige schwere und keine tödliche VI auftrat, stehen im Einklang mit den genannten Untersuchungen. Die im Vergleich zur Literatur niedrige Inzidenz von 12 VI bei 67 Patienten kann im Zusammenhang mit der ausschließlichen Anwendung von CSA in Kombination mit MP zur Immunsuppression gesehen werden (81, 115).

Die Frage, ob das Monitoring der LGL im MNK als Screening-Methode zur frühen Erkennung von VI nach Nierentransplantation sinnvoll ist, sollte in einer prospektiven Studie mit erheblich höherer Patientenzahl untersucht werden.

4.4 Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei zellulärer Transplantatreaktion und Virusinfektion

Die Einführung von McAb ermöglichte es, LYSP auf einfache Weise zu unterscheiden, und eventuelle Veränderungen dieser Zellen im Blut von Nierentransplantatempfängern bei VI und AR zu untersuchen.

Gesamt-T-Lymphozyten wurden mit dem McAb OKT 3 erfaßt, der diese Zellen unter bestimmten Umständen auch zur Proliferation anregen kann (22, 127, 161, 162).

T-Helferzellen markiert der McAb OKT 4. Helferzellen sind sowohl zur Stimulation der zytotoxischen T-Lymphozyten als auch der Suppressor-T-Lymphozyten als auch zur Stimulation weiterer Helfer-Zellen notwendig. Sie induzieren die

Umwandlung von B-Zellen zu Plasmazellen und deren Ig-Produktion (126, 128).

Der McAb OKT 8 ist gegen Suppressor- und Killer-T-Lymphozyten gerichtet. Eine weitere Unterscheidung zwischen Suppressor- und Killerzellen aufgrund unterschiedlicher Oberflächenantigene ist bisher nicht möglich. Gemeinsam sind Helfer- und Suppressorzellen für die Regulation der zellulären und humoralen Immunantwort notwendig.

In mehreren Studien konnte eine Abnahme der Gesamt-T-, der T_h - und der $T_{s/k}$ -Zellen unter Immunsuppression belegt werden (38, 150, 152).

Zahlreiche Autoren fanden im Vergleich zu Normalpersonen eine Abnahme des Verhältnisses von T_h - zu $T_{s/k}$ -Zellen nach Nierentransplantation, bedingt durch eine relative Zunahme der $T_{s/k}$ -Zellen (25, 30, 38, 114, 131). PENLINE und Mitarbeiter beobachteten diese Abnahme des $T_h/T_{s/k}$ -Zellverhältnisses nur, wenn mindestens ein DR-mismatch zwischen Spender und Empfänger vorlag. Null "mismatches" führten nicht zur Abnahme des $T_h/T_{s/k}$ -Verhältnisses (114). Einige Untersucher fanden vor AR einen Anstieg der erniedrigten $T_h/T_{s/k}$ -Ratio auf Normalwerte, dem eine Zunahme der T_h -Zellen zugrunde lag (25, 30, 114, 146, 150, 152). Andere Untersucher konnten keine Veränderung im Verhältnis von T_h - zu $T_{s/k}$ -Zellen vor AR feststellen (10, 21, 168). Die Art der Immunsuppression hatte dabei keinen Einfluß.

In dieser Studie konnte keine Veränderung des $T_h/T_{s/k}$ -Zellverhältnisses bei verschiedenen Schweregraden einer ZTR festgestellt werden. Im Vergleich zu Normalwerten war auch keine Abnahme der $T_h/T_{s/k}$ -Ratio nach Transplantation nachzuweisen. Die Beobachtung, daß die Summe aus T_h - und $T_{s/k}$ -Zellen größer ist als die Gesamtzahl der T-Lymphozyten wurde auch von anderen Untersuchern gemacht (25, 150). Unreife T-Zellen, die T_h - und $T_{s/k}$ -Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, sind aus dem Blut von Patienten nach Nierentransplantation isoliert worden und stellen eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen dar (25, 131).

Bei VI der Herpesgruppe konnten in dieser Studie Unterschiede der LYSP gegenüber ZTR nachgewiesen werden. Die Zahl der T_h -Zellen war bei VI signifikant erniedrigt, die der $T_{s/k}$ -Zellen erhöht. Das Verhältnis von T_h - zu $T_{s/k}$ -Zellen, das bei allen Graden der ZTR 1,4 war, erniedrigte sich bei VI auf durchschnittlich 0,6 und war in keinem Fall 1.

Eine solche Umkehr des normalen Verhältnissen von T_h - zu $T_{s/k}$ -Zellen ist bei CMV- als auch bei EBV- und HSV-Infektionen beschrieben. VI der Herpesgruppe führen zu einer Abnahme der T_h -Zellen und gleichzeitiger Zunahme der $T_{s/k}$ -Zellen, die bei engmaschiger Überwachung bereits einige Tage vor dem Auftreten von IgM-Antikörpern im Serum des Patienten gefunden werden kann (24, 130, 144). Während der Rekonvaleszenzphase nach VI steigt die Zahl der T_h -Zellen langsam wieder an, die $T_{s/k}$ -Zellen gehen auf Normalwerte zurück. CARNEY et al. fanden, daß diese Umkehr bei CMV-Infektionen bis zu 10 Monate bestehen bleiben kann, und bei EBV-Infektionen nach 2 Monaten das normale Verhältnis wiederhergestellt ist (24). Parallel zu den zahlenmäßigen Veränderungen der LYSP kann bei CMV- und EBV-Infektionen eine verminderte Reaktion der T-Zellen auf mitogene Stimulation und eine herabgesetzte Ig-Produktion der B-Zellen festgestellt werden (24, 130). Darin könnte ein Grund für das erhöhte Risiko der bakteriellen und mykotischen Superinfektion während VI gesehen werden (101, 144).

ALy konnten mit dem McAb OKT 10 zwar bei VI signifikant häufiger als bei ZTR I und II gefunden werden, bei ZTR III waren diese Zellen aber ebenso im Blut nachweisbar wie bei VI. Das könnte bedeuten, daß ALy nicht eine spezifische Reaktion auf die VI sind, sondern eher unspezifische Marker einer Aktivierung des Immunsystems (15).

Die Anzahl der B-Lymphozyten im MNK war in dieser Studie bei VI und ZTR nahezu gleich. Im Gegensatz zu Untersuchungen von STADLER fand sich auch bei schwerer CMV-Infektion kein Anstieg dieser Zellen im Blut (150). Aufgrund der geringen Fallzahl, der unregelmäßigen

Probenentnahme und der Tatsache, daß nicht zwischen primären Infektionen und Reaktivierungen unterschieden wurde, ist dieses Ergebnis allerdings nur mit Einschränkungen zu werten. Ein B-Zellmonitoring zur frühzeitigen Unterscheidung zwischen VI und ZTR scheint nicht sinnvoll.

Die Anzahl der DR-Antigene präsentierenden Zellen im p.B. unterschied sich in dieser Studie weder innerhalb der verschiedenen Grade einer ZTR, noch zwischen VI und ZTR. VAN ES und Mitarbeiter fanden im Gegensatz dazu einen Anstieg der DR-Antigen positiven Zellen innerhalb der $T_{s/k}$ -Zellpopulation während AR. Da diese Zunahme auch bei CMV-Infektionen vorkam, wurde sie jedoch als ein unspezifisches Phänomen gewertet (34).

4.5 Diskussion der Fallbeschreibung

Im po-Verlauf des Patienten K.H. lassen sich die wesentlichen bisher diskutierten Ergebnisse exemplarisch darstellen. Da es sich bei dem Patienten um eine Zweittransplantation handelte, wurde die Immunsuppression während der ersten 12 Tage nach dem Triple-Drug-Schema durchgeführt (63). Das Transplantat funktionierte nie ausreichend, und der Patient blieb mit Creatininwerten von 10 mg% dialysepflichtig. Zeichen einer AR oder von CSA-Toxizität lagen nicht vor, so daß am ehesten ein ischämischer Konservierungsschaden für die Funktionslosigkeit des Transplantates in Frage kam.

In FNB am 19. und 23. po-Tag konnte keine wesentliche Inflammation nachgewiesen werden, im MNK herrschten Lymphozyten und Monozyten vor und das T_h - $T_{s/k}$ -Zellverhältnis war normal. Eine am 29. po-Tag durchgeführte Stanzbiopsie erbrachte im Gegensatz dazu den Befund einer ausgeprägten ZTR. Eine Abstoßungstherapie wurde eingeleitet, die Transplantatfunktion besserte sich jedoch nicht. Die Diskrepanz zwischen dem Stanzbiopsie- und dem FNB-Befund läßt eventuell sich darauf zurückführen, daß die

ZTR im Befund des Pathologen als herdförmig beschrieben wurde.

Eine FNB am 25. po-Tag zeigte eine vorwiegend lymphozytäre ZTR II, die sich am 30. po-Tag nicht bestätigte, was ebenfalls auf eine herdförmige Inflammation schließen läßt.

Um den 29. po-Tag traten klinische Symptome einer VI auf, die Immunsuppression wurde abgesetzt. Serologisch ließ sich die Diagnose zu diesem Zeitpunkt nicht sichern. Im MNK wiesen aber ein geringer Anstieg der Blastzellen, vor allem aber eine relative Lymphozytose (60 %) und ein Absinken der T_h -Zellen auf eine VI hin.

Infolge des Auslassens der Immunsuppression wurden am 36. und am 38. po-Tag in der FNB schwerste ZTR III diagnostiziert, die mit ATG therapiert wurde. Im MNK verstärkten sich die Hinweise auf eine VI: relative Lymphozytose mit Blastzellen bestand weiterhin, die LGL stiegen langsam an und die T_h -Zellen waren bis auf das Niveau der $T_{s/k}$ -Zellen abgesunken.

Am 44. po-Tag, also 9 Tage nachdem im MNK eindeutige Zeichen einer beginnenden VI aufgetreten waren, konnte serologisch eine frische CMV-Infektion diagnostiziert werden. Klinisch bestand nun eine schwerste CMV-Infektion mit cerebraler und pulmonaler Beteiligung, die zur Verlegung des Patienten auf die Intensivstation zwang und eine Respiratortherapie nötig machte. Im Transplantat bestand eine vorwiegend lymphozytäre Inflammation mit Beteiligung von ALy und LGL, die einer interstitiellen Nephritis entsprach, wie sie bei generalisierter CMV-Infektion beschrieben ist (94, 149).

Zusammenfassend bestätigt dieser Verlauf, daß die ZTR, die primär im Transplantat stattfindet, sich mit der FNB feststellen läßt, und keine Veränderungen im p.B. zu finden sind, die eine Diagnosestellung erlauben würden. Dagegen werden systemische VI, die sekundär zu einer Beteiligung des Transplantates führen können, durch Veränderungen in der Zusammensetzung der LYSP im MNK sehr frühzeitig diagnostiziert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Untersuchung wurde an 67 Patienten nach Nierentransplantation durchgeführt. Die immunsuppressive Therapie bestand aus einer Kombination von CSA und MP. Es wurden 152 FNAC und 166 MNK zytologisch und durch Markierung mit McAb untersucht.

Die Auswertung der FNB erbrachte folgende Ergebnisse:

1. In der FNAC ließ sich eine mononukleäre Inflammation des Transplantates zuverlässig erfassen und zytologisch charakterisieren.
2. Zunehmende Schweregrade einer ZTR waren im wesentlichen durch ein Ansteigen der lymphozytären und monozytären Infiltration des Transplantates gekennzeichnet.
3. ALy stiegen im Transplantat parallel zum Schweregrad einer ZTR an. LB kennzeichneten die schwere ZTR.
4. LGL waren bei schwerer ZTR im Transplantat vermehrt, ihr Anteil an der Gesamtzahl der inflammatorischen Lymphozyten blieb jedoch bei allen Schweregraden einer ZTR unverändert.
5. Unter CSA-Immunsuppression konnte eine geringgradige Inflammation auch ohne klinische Anzeichen einer AR beobachtet werden.
6. Bei VI konnte in 5 von 7 Fällen eine mittelgradige bis schwere ZTR diagnostiziert werden. In diesen 5 Fällen handelte es sich um primäre CMV-Infektionen. CMV-Reaktivierung und HSV-Infektion waren nicht von einer ZTR begleitet.
7. Eine unterschiedliche Zusammensetzung der mononukleären Inflammation zwischen VI und ZTR III wurde lediglich bei den Monozyten festgestellt, die während VI in geringerer Anzahl vorkamen.
8. LGL kamen nach Korrektur der Blutkontamination in der FNAC bei VI und ZTR III gleich häufig vor.

Folgende Resultate ergab die Auswertung der MNK:

1. Signifikante Veränderungen der Zusammensetzung der MNZ im p.B., die Rückschlüsse auf das Verteilungsmuster der inflammatorischen Zellen im Transplantat zuließen, wurden nicht gefunden.
2. LGL kamen im Blut von Patienten, die mit Viren der Herpesgruppe infiziert waren, in größerer Anzahl vor als im Blut von Patienten mit ZTR III. Dieser Unterschied war bei Berechnung der LGL/mm³ am größten, weil die virusbedingte relative Lymphozytose berücksichtigt wurde.
3. Veränderungen der T-Lymphozytensubpopulationen im Blut konnten bei ZTR I-III nicht gefunden werden.
4. Eine Umkehr des normalen Verhältnisses von T-Helfer- zu T-Killer/Suppressor-Zellen im Blut wurde bereits einige Tage vor dem serologischen Nachweis einer VI beobachtet. Diese Konversion war durch ein Absinken der T-Helfer-Zellen und gleichzeitiges Ansteigen der T-Killer/Suppressor-Zellen bedingt.
5. ALy konnten mit dem McAb OKT 10 bei generalisierter VI gegenüber ZTR I und II vermehrt gefunden werden. Schwere ZTR und VI unterschieden sich in Bezug auf die ALy im p.B. nicht, so daß die Zunahme dieser Zellen wahrscheinlich eine unspezifische Reaktion ist.
6. B-Lymphozyten waren bei VI und allen Schweregraden einer ZTR im Blut gleich häufig.
7. Die Anzahl DR-Antigen präsentierender Zellen zeigte in allen untersuchten Gruppen keinen Unterschied.

Ein Monitoring der mononukleären Zellen im Blut von nierentransplantierten Patienten erwies sich somit als diagnostisches Verfahren zur Erkennung von zellulären Infiltraten im Transplantat als untauglich. Dagegen können Veränderungen der Zusammensetzung mononukleärer Zellen im Blut frühzeitig auf eine beginnende Virusinfektion hinweisen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abo, T., Balch, C.M.: A differentiation antigen of human NK and K-cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). J. Immunol. 127:1024-1029 (1981)
2. Albert, E.: Histokompatibilitätstestung und ihre klinische Relevanz. In: R. Pichlmayr (Hrsg.) Transplantationschirurgie. Springer Verlag, 171-200 (1981)
3. Albert, E., Scholz, S.: Das Haupthistokompatibilitätssystem (HLA) des Menschen: Serologie, Genetik und klinische Bedeutung. Immunforschung in Klinik u. Labor, Fresenius Stiftung, 77-105 (1979)
4. Albert, F.W., Seybold-Epting, W., Kreiter, H.: Praxis der Nierentransplantation (II): Schattauer Verlag Stuttgart New York (1984)
5. Ascher, N.L., Chen, S., Hoffman, R., Simmons, R.L.: Maturation of cytotoxic effector cells at the site of allograft rejection. Transplant. Proc. 13:1105-1107 (1981)
6. Ax, W.: Monoklonale Antikörper durch Lymphozytenhybridisierung. Laboratoriumsblätter 30:89-99 (1980) Behringwerke AG.
7. Begemann, H.: Praktische Hämatologie. Thieme Verlag (1982)
8. Bergstrand, A., et al.: Renal histopathology in kidney recipients immunosuppressed with cyclosporin A: results of an international workshop. Clin. Nephrol. 24, 3:107-119 (1985)

9. Betts, R.F.: Cytomegalovirus infection in transplant patient. *Prog. Med. Virol.* 28:44-64 (1982)
10. Binkley, W.F., Valenzuela, R., Braun, W.E., Deodhar, S.D., Novick, A.C., Steinhöller, D.R.: Flow cytometry quantitation of peripheral blood (PB) T-cell subsets in human allograft recipients. *Transpl. Proc.* 15, 1:1163-1165 (1983)
11. Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U.: Biological effect of Cyclosporin-A. A new antilymphocytic agent. *Agent actions* 6:468-475 (1976)
12. Borel, J.F., Feurer, C., Magnee, C., Stahelin, M.: Effects of the new antilymphocytic peptide Cyclosporin-A in animals. *Immunology* 32:1017-1025 (1977)
13. Borel, J.F., Lafferty, K.J.: Cyclosporine: Speculations about its mechanism of action. *Transplantation Proc.* 15:1881-1885 (1983)
14. Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl. 97):77-89 (1968)
15. Brando, B., Civati, G., Grillo, C., Buchach, G., Colussi, G., Broggi, M.L., Minetti, L.: Immunological monitoring of viral infections in renal transplant recipients. *Proc. EDTA* 20:265-269 (1983)
16. Brendel, W.: The clinical use of ALG. *Transpl. Proc.* 3:280-286 (1971)
17. Brendel, W., Seifert, J., Ring, J.: Die klinische Anwendung von Antilymphozytenglobulin. *Münch. Med. Wschr.* 117:1361-1365 (1975)

18. Burdick, J.F., McGraw, D., Bender, W., Beschornow, W.E., Williams, G.M., Solez, K.: Renal allograft infiltrate in the absence of rejection. *Transpl. Proc.* 16, 6:1580-1582 (1984)
19. Calne, R.Y., White, D.J.G., Thirn, S.: Cyclosporin-A in patients receiving renal allografts from Cadaver donors. *Lancet* 2: 1323-1327 (1978)
20. The Canadian Multicenter Transplant Study Group: A randomized clinical trial of cyclosporine and cadaver renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 309:809-815 (1983)
21. Carter, N.P., Cullen, P.R., Thompson, J.F., Benich, A.L.T., Wood, R.F.M., Morris, P.J.: Monitoring of lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients. *Transpl. Proc.* 15, 1: 1157-1159 (1983)
22. Chang, T.W., Kung, P., Gingses, S.P., Goldstein, G.: Does OKT 4 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure in human T-cells? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1805-1808 (1981)
23. Charpentier, B., Fries, D., Lang, B., Martin, B., Raguin, G., Prutchansky, A.: Natural killer activity during cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transpl. Proc.* 15, 1:384-386 (1983)
24. Corney, W.P., Rubin, R.H., Hoffman, R.A., Hansen, W.P., Healey, K., Hirsch, M.S.: Analysis of T-lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.* 126:2114-2116 (1981)

25. Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Burton, R.C., Rubin, R.H., Goldstein, G., Kung, P.C., Hansen, W.P., Delmonico, F.L., Russell, P.S.: Use of monoclonal antibodies to T-cell subset for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 305, 6: 300-314 (1981)
26. Donatsch, P., Abisch, E., Homberger, M., Traber, R., Trapp, M., Voges, R.: A radioimmunoassay to measure Cyclosporin A in plasma and serum samples. *J. Immunoassay* 2 (1):19-32 (1981)
27. Dunn, D., White, D., Herbertson, B., Rolles, K.: Detrimental effect of steroids on Cy-A induced prolonged allograft survival. *Transpl. Proc.* 12, 2:335-338 (1980)
28. Dupont, E., Huygen, K., Schandene, L., Vandercruys, M., Palfliet, K., Wybran, J.: Depressed natural killer function in transplant recipients: An analysis. *Transpl. Proc.* 16, 6:1506-1507 (1984)
29. Egidi, F., DeVecchi, A., Banfi, G., Tarantino, A., Imbasciati, E., Ponticelli, G.: Comparison of renal biopsy and fine needle aspiration biopsy in renal transplantation. *Transplan. Proc.* 27, 1:61-63 (1985)
30. Ellis, T.M., Lee, H.M., Mohanakuman, T.: Alterations in human regulatory T-lymphocyte subpopulations after renal allografting. *J. Immunol.* 127, 6:2199-2209 (1981)
31. Ellis, T.M., Berry, C.R., Mendez-Picon, G., Goldman, M.H., Lee, M.H., Mohanakumar, T.: Lack of Association of human renal allograft rejection and circulating K-cell, NK-cell or total T-cell levels. *Clin. Immunol. & Immunopath.* 25:335-347 (1982)

32. Ennis, F.A., Rook, A.H., Yi-Hua, Q.: HLA-restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines. *Lancet* 2:887-891 (1981)
33. Ertel, W.: Zytoimmunologisches Monitoring nach allogener und xenogener Herztransplantation im Tiermodell. LMU München (1986)
34. van Es, A., Baldwin, W.M., Oljans, P.J., Tanke, M.J., Ploem, J.S., van Es, L.A.: Expression of HLA-DR on T-lymphocytes following renal transplantation and association with graft rejection episodes and cytomegalovirus infection. *Transplantation* 37, 1:65-69 (1984)
35. van Es, A., Meyer, C.J.L.M., Oljans, P.J., Tanke, H.J., van Es, L.A.: Mononuclear cells in renal allografts. *Transplantation* 37, 2:134-139 (1984)
36. European Multicenter Trial Group: Cyclosporin and cadaver renal transplantation: one year follow-up of a multicenter trial. *Lancet* 2:986-989 (1983)
37. Ewald, R.W.: Die direkte serologische Crossmatch-Reaktion vor Nierentransplantation. In: F.W. Albert (Hrsg.) *Praxis der Nierentransplantation*. Schattauer Verlag Stuttgart, 41-51 (1980)
38. Fregona, J., Guttman, R.D., Jean, R.: HNK-1⁺ (Leu-7) and other lymphocyte subsets in long-term survivors with renal allotransplants. *Transplantation* 39, 1:25-29 (1985)

39. Frösner, G.G., Wolf, H., Bayer, M., Schleibner, S., et al.: Ätiologisches Spektrum, Epidemiologie und Diagnose von Viruserkrankungen bei abwehrgeschwächten Patienten: Ergebnis einer Studie in Nierentransplantationsempfängern. Zeitschrift für Fortschritte der antimikrobiellen Chemotherapie. 3-6:935-944 (1984)
40. Fryd, D.S., Peterson, P.K., Ferguson, R.M., Simmons, R.L., Balfour, H.H.: Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation. Transplantation 30:436-439 (1980)
41. Gastl, G., Schmalzl, F., Huhn, D., Gattringer, C., Huber, C.: Large granular lymphocytes: Morphological and functional properties. I. Results in Normals. Blut 46:297-310 (1983)
42. Gastl, G., Niederwieser, D., Marth, C., Huber, H., Egg, D., Schuler, G., Margreiter, R., Braunsteiner, H., Huber, C.: Human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer cell activity in various disease states. Blood 64, 1:288-295 (1984)
43. Gehrz, R.C., Ruttich, S.R.: Cytomegalovirus (CMV)-specific lysis of CMV-infected target cells can be mediated by both NK-like and virus-specific cytotoxic T-lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 61:80-89 (1985)
44. Glenn, J.: Cytomegalo virus infections following renal transplantation. Rev. Infect. Dis. 3:1151-1178 (1981)
45. Häyry, P.: Immunobiology of transplant rejection. Ann. Clin. Res. 13:172-198 (1981)
46. Häyry, P.: Transplantataspirationszytologie zur Überwachung von Nieren-Allotransplantaten. Triangel 21, 4:111-121 (1982)

47. Häyry, P., von Willebrand, E.: Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts. *Ann. Clin. Res.* 13:288-306 (1981)
48. Häyry, P., von Willebrand, E.: Transplant aspiration cytology in diagnostic evaluation of renal allografts. *Transpl. Proc.* 13, 3:1575-1578 (1981)
49. Häyry, P., von Willebrand, E.: Transplant aspiration cytology. *Transplantation* 38:7-12 (1984)
50. Häyry, P., Soots, A., von Willebrand, E., Wiktorowitz, K.: Composition, subclassdistribution, and preliminary analysis of the functions of host inflammatory cells, infiltrating renal allografts during rejection. *Transplant. Proc.* 11, 1:785-789 (1979)
51. Häyry, P., von Willebrand, E., Soots, A.: In situ effector mechanism in rat kidney allograft rejection. III. Kinetics of the inflammatory response and generation of donor directed killer cells. *Scand. J. Immunol.* 10:95-108 (1979)
52. Häyry, P., von Willebrand, E., Ahonen, J., Eklund, B., Lautenschlager, J.: Monitoring of organ allograft rejection by transplant aspiration cytology. *Ann. Clin. Res.* 13:264-287 (1981)
53. Hall, J.G.: Studies of the cells in the afferent and efferent lymph of lymphnode draining the site of skin allografts. *J. Exp. Med.* 125:737-749 (1967)
54. Hallmann, L.: *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Thieme Verlag Stuttgart, 10. Auflage, 338-353 (1966)

55. Hamburger, J., Dimitrin, A., Bankir, J., Delray-Sachs, M., Auvert, J.: Collection of lymph from kidneys homotransplanted in man: cell transplantation in vivo. *Nature* 232:633-645 (1971)
56. Hamilton, D.V., Evans, D.V., Thirn, S.: Toxicity of cyclosporin A in organ grafting. In: White, D.J.G. (Hrsg.). Elsevier Biomedical Press Amsterdam New York, 393-411, 1982
57. Hamilton, J.D., Seaworth, B.J.: Transmission of latent cytomegalievirus in a murine kidney tissue transplantation model. *Transplantation* 39, 3:290-296 (1985)
58. Hammer, C.: Kontrolle von Nierentransplantatabstoßungen - Anwendung der Feinnadelaspirationszytologie. *Münch. Med. Wschr.* 125:45-49 (1982)
59. Hammer, C., Chaussy, Ch., Brendel, W.: Preformed natural antibodies in animals and man. *Europ. Surg. Res.* 5:182 (1973)
60. Hammer, C., Mayer, P., Bantien, F., Kreuzer, E., Land, W.: Fine needle aspiration cytology, a new tool to monitor the effect of immunosuppressive therapy on in situ inflammation in human kidney grafts. 13. Tagung der Ges. Immunol. Luzern, 1981
61. Hammer, C., Land, W., Stadler, J., Koller, C., Brendel, W.: Lymphocyte subclasses in rejecting kidney grafts detected by monoclonal antibodies. *Transpl. Proc.* 15:356-360 (1983)

62. Hammer, C., Land, W., Koller, C., Stadler, J., Weber, B., Welte, M.: Analyse von Lymphozytensubpopulationen im zirkulierenden Blut und im Transplantat nach Nierentransplantation. Praxis der Nierentransplantation. F.K. Schattauer Verlag Stuttgart New York, 295-304, 1984

63. Hammer, C., Banthien, F., Hillebrand, G., Nguyen, H., Dendorfer, M., Land, W.: Results from double fine needle biopsies (FNB) after randomized evaluation. 3rd Int. Workshop on Transplant Aspiration Cytology. March 4-6, Mayrhofen (1985)

64. Hancock, W.W., Jee, D., De Moerloose, P., Ricklres, R., Ewan, V.A., Atkins, R.C.: Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft rejection. Transplantation 39, 4:430-438 (1985)

65. Heidecke, C.D., Arango, J.L., Kupiec-Weglinski, J.W., Abberd-Fillko, M., Arandeda, D., Stadler, J., Siewert, J., Strom, F.B., Tilney, N.J.: Lack of evidence for an active role for natural killer cells in acute rejection of organ allografts. Transplantation 40, 4:441-443 (1985)

66. Held, E., Edmaier, M.A.: Diagnostik bei Abstoßungsreaktion: Praxis der Nierentransplantation, F.W. Albert, Schattauer Verlag Stuttgart, 175-190 (1980)

67. Heron, J., Moller-Lausen, A., Berg, K.: Effector cell involved in cell-mediated cytotoxicity of cells infected with herpes simplex virus type I. Infect. Immun. 16:40-53 (1977)

68. Ho, M., Swansirikul, S., Dowling, J.N.: The transplanted kidney as source of cytomegalovirus infection. N. Engl. J. Med. 293:1109-1112 (1975)

69. Hoitsma, A., Reekers, P., Kreefterberg, J.: Treatment of acute rejection of cadaveric renal allografts with rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 33, 1:12-16 (1982)
70. Huhn, D., Huber, C., Gastl, G.: Large granular lymphocytes: morphological studies. *Eur. J. Immunol.* 12:985-988 (1982)
71. Jordan, M.C., Shanley, J.D., Stenvens, J.G.: Immunosuppression reactivates and disseminates latent murine cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 37:419-423 (1977)
72. Kammor, G.M., Smitz, J.A., Mitchell, R.: Capping of human T-cell specific determinants: Kinetics of capping and receptor re-expression and regulation by the cytoselection. *J. Immunol.* 130, 1:38-44 (1983)
73. Kimber, J.: Natural killer cells. *Med. Lab. Sciences* 42:60-77 (1985)
74. Kirkpatrick, Ch., Leech, St.: Transplantation immunology: Clinical aspects. *JAMA*, Nov. 26, 248, 20:2727-2733 (1982)
75. Kirmani, N., Guin, R.K., Nittal, K.K., Manischewitz, J.F., Quinnan, G.V.: Cytomegalovirus-specific cytotoxicity mediated by Non-T-lymphocytes from peripheral blood of normal volunteers. *Infect. Immun.* 34, 2:441-447 (1981)

76. Klintmaln, G., Bergstrand, A., Ringden, O., Wassermann, J., Collste, H., Lundgren, G., Wilczek, H., Groth, C.G.: Graft biopsy for the differentiation between nephrotoxicity and rejection in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transpl. Proc.* 15:493-496 (1983)
77. Klintmaln, G., Bohman, S.O., Sundelni, B., Wilczek, H.: Interstitial fibrosis in renal allografts after 12 to 46 months of cyclosporin-treatment. Beneficial effects of lower doses early after transplantation. *Lancet* 2:950-954 (1984)
78. Koller, C.: Überwachung der immunologischen Ereignisse in allogenen Nierentransplantaten mit Hilfe der Feinnadelaspirationszytologie in Verbindung mit einem elektronischen Coulter Counter. - Untersuchung der technischen Durchführung und Zuverlässigkeit sowie kritische Betrachtung von Aussagekraft, Wert, und Indikation der Methode in Zusammenhang mit klinischen Parametern und der Stanzbiopsie. LMU München, 1985
79. Koller, C., Hammer, C., Gokel, J.M., et al.: Correlation between core biopsy and aspiration cytology. *Transplant. Proc.* 16, 5:1298-1300 (1984)
80. Kupiec-Weghinski, J.W., Oltewski, W.L., Tilney, N.L.: Changes in lymphocyte migration patterns after heart grafting in rats. *Transpl. Proc.* 13:1108-1110 (1981)
81. Kurtz, J.B., Thompson, J.F., Ting, A.: The problem of cytomegalovirus infection in renal allograft recipients. *Quart. J. Med.* 211:341-349 (1984)
82. Land, W.: Transplantationszentrum München 1976-1980, 110-112 (1982)

83. Land, W., Illner, W.-D., Fink, R.A., Castro, L.A.: Kombinierte Immunsuppression nach Nierentransplantation - Cyclosporin A in Kombination mit Azathioprin und Methylprednisolon. Münch. Med. Wschr. 125, 17:361-363 (1983)
84. Land, W., Castro, L.A., White, D.J.G., Hillebrand, G., Hammer, C., Klare, B., Fornara, P.: Ciclosporin A in renal transplant. Prog. in Allergy 38:293-328 (1986)
85. Larsson, E.: CyA and Dexamethason suppress T-cell response by selectively acting at distinct sites of the triggering process. J. Immunology 124, 6:2828-2833 (1980)
86. Lenhard, V., Dreikorn, K., Opelz, G.: Aktuelle immunologische Aspekte der Nierentransplantation. Urologe 21:280-289 (1982)
87. Levey, A.S.: The improving prognosis after kidney transplantation. New strategies to overcome immunologic rejection. Arch. Intern. Med. 144:2382-2387 (1984)
88. Lotzova, E., Savary, C.A.: Possible involvement of natural killer cells in bone marrow graft rejection. Biomedicine 27:341-344 (1977)
89. MacPherson, G.G., Murphey, M.J., Morris, B.: The traffic of mononuclear phagocytes through renal allografts in sheep. Transplantation 24:16-28 (1977)
90. Marker, S.C., Ascher, N.L., Kallis, J.M., Simmons, R.L., Najarian, J.S., Balfour, M.M.: Epstein-Barr-Virus antibody response and clinical illness in renal transplant recipients. Surgery 85:433-440 (1979)

91. Mason, D.W., Morris, P.J.: Inhibition of the accumulation in rat kidney allografts, of specific - but not nonspecific - cytotoxic cells by cyclosporin. *Transplantation* 37, 1:46-51 (1984)

92. Mayo, D., Armstrong, J.A., Ho, M.: Activation of latent cytomegalovirus infection: cocultivation, celltransfer, and the effect of immunosuppression. *J. Infect. Dis.* 138:890-896 (1978)

93. McMaster, P., Haynes, I.G., Michael, J., et al.: Cyclosporine and cadaveric renal transplantation: a prospective randomized trial. *Transpl. Proc.* 15:2523-2527 (1983)

94. Meyers, J.D.: Cytomegalovirus infection (Cytomegalic inclusion disease). In: Petersdorf, Adams, Brennwald, Isselbader, Martin, Wilson (Hrsg.) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 10th Edition 1983.

95. Mihatsch, M.J., Judat, F., Zollinger, M.U.: Morphologische Kriterien der Transplantatabstoßung. In: Albert, F.W. (Hrsg.) *Praxis der Nierentransplantation*. Schattauer Verlag Stuttgart, 191-200, 1980

96. Misko, I.S., Moss, D.J., Pope, J.H.: HLA-antigen-related restriction of T-lymphocyte cytotoxicity to Epstein-Barr-Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* 77:4247-4250 (1980)

97. Montgomery, J.Z., Becroft, D.M.O., Croxon, M.C., Doak, P.B., Norter, D.K.: HSV-infection after renal transplantation. *Lancet* 2:867-870 (1969)

98. Morimoto, E.L., Distaso, J., Borel, Y., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L.: Communicative Interactions between subpopulations of human T-lymphocytes required for generation of suppressor-effector function in primary antibody response. *J. Immunol.* 128:1645-1650 (1982)
99. Morris, P.J., Ting, A.: The cross-match in renal transplantation. *Tissue Antigens* 17:75 (1981)
100. Mourad, G., Chong, Pouliquen, M., Rinz, G., Mandin, J., Mion, C.: Withdrawal of azathioprine and anti-lymphocyte globulins in kidney transplant recipients with cytomegalovirus. *Transpl. Proc.* 16:1313-1315 (1984)
101. Najarian, H.S., Rubin, R.M.: Infections in renal transplant patients. In: Rubin, R.M., Young, L.S. (Hrsg.): *Clinical approach to infection in the compromised host*. New York, Plenum Medical Books, 553-606 (1981)
102. Najarian, J.S., Fryd, D.S., Strand, M., Ascher, N.L., Payne, W.D., Simmons, R.L., Sutherland, D.E.R.: A single institution, randomized, prospective trial of cyclosporine versus azathioprine-anti-lymphocyte globulin for immunosuppression in renal allograft recipients. *Ann. Surg.* 2:142-157 (1985)
103. Natusch, R., Kettler, L.H.: Nierenbiopsie. In: Dutz, H., Gustav, V.E.B. (Hrsg.) *Nierendiagnostik*. Fischer Verlag, 268-327 (1972)
104. Nemlander, A., Soots, A., von Willebrand, E., Häyry, P.: Redistribution of rat renal allograft-responding leukocytes during rejection, 1. *Model. Cell. Immunol.* 70:55-64 (1982)

105. Nemlander, A., Soots, A., von Willebrand, E., Husberg, B., Häyry, P.: Redistribution of renal allograft responding leukocytes during rejection: II. Kinetics and specificity. *J. Exp. Med.* 156:1087-1100 (1982)
106. Nemlander, A., Saksela, E., Häyry, P.: Are "natural killer" cells involved in allograft rejection? *Eur. J. Immunol.* 13:348-350 (1983)
107. Nemlander, A., Soots, A., Häyry, P.: In situ pathways of allograft destruction: 1. Generation of the cellular effector response in the graft and the graft recipient. *Cell. Immunol.* 89:409-419 (1984)
108. Opelz, G., Terasaki, P.J.: Improvement of kidney graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N. Engl. J. Med.* 299:799-803 (1978)
109. Parfrey, P.S., Kuo, Y.L., Hanley, J.A., Knaach, J., Xue, Z., Lisbona, R., Guttman, R.D.: The diagnosis and prognostic value of renal allograft biopsy. *Transplantation* 38, 6:586-590 (1984)
110. Pass, R.F., Griffiths, P.D., August, P.M.D.: Antibody response to CMV after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections. *J. Infect. Dis.* 147, 1:40-46 (1983)
111. Pasternack, A.: Fine needle aspiration biopsy of human renal homografts. *Lancet* 2:82-87 (1968)
112. Pasternack, A., Virolanien, M., Häyry, P.: Fine needle aspiration in the diagnosis of human renal allograft rejection. *Urol.* 109:167-172 (1973)

113. Pedersen, N.C., Morris, B.: The role of the lymphatic system in the rejection of homografts: A study of lymph from renal transplants. *J. Exp. Med.* 131:936-948 (1970)
114. Peenline, K.J., Edwards, M.G., White, S., Gelfaud, M., Helfrich, G.B.: T-cell subset analysis and immune monitoring of kidney transplant recipients experiencing reversal or non reversal of steroid-resistant rejection by plasma leukophereses. *Transpl. Proc.* 16, 6:1550-1554 (1984)
115. Peterson, P.K., Rynaiewicz, J.J., Simmons, R.L., Ferguson, R.M.: Decreased incidence of overt CMV disease in renal allograft recipients receiving CSA. *Transpl. Proc.* 15:457-459 (1983)
116. Prince, M.E., Ettenger, R.B., Dorey, F.J., Richard, N.F., Fahey, J.L.: Azathioprine suppression of natural killer activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity in renal transplant recipients. *J. Clin. Immunol.* 4, 4:312-318 (1984)
117. Quinnan, G.V., Kirmani, N., Esber, E., Saral, R., Manischewitz, J., Rogers, J.L., Rook, A.H., Santos, G.W., Burns, W.H.: HLA restricted cytotoxic T-lymphocyte and non-thymic cytotoxic lymphocyte responses to cytomegalovirus infection of bone marrow transplant recipients. *J. Immunol.* 126:2036-2041 (1981)
118. Quinnan, V.Q., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., Burns, W.H.: Cytotoxic T-cells in cytomegalovirus infection. HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 307, 1:7-13 (1982)

119. Qisrud, M., Thorsley, E.: Influence of in vitro hydrocortisone on some human blood lymphocyte subpopulations. I. Effect on NK-activity. Scand. J. Immunol. 13:573-579 (1981)
120. Rabin, B.: Immunologic aspects of human cardiac transplantation. Heart Transpl. 2:188-190 (1983)
121. Ramsey, K.M., Djen, J.J., Rook, A.H.: Decreased circulating large granular lymphocytes associated with depressed natural killer cell activity in renal transplant recipients. Transplantation 38, 4:351-356 (1984)
122. Reichenspurner, H., Ertel, W., Hammer, C., Peters, D., Welz, A., Überfuhr, P., Reichart, B., Kemkes, B., Gokel, J.: Xenogenic and allogenic heterotropic hearttransplantation in dogs - a model for diagnosis of rejection mechanisms. Heart Transpl.
123. Reichenspurner, H.: Zytologische und immunologische Überwachung herztransplantierter Patienten in München. LMU München (1986)
124. Reichenspurner, H., Kemkes, B.M., Osterholzer, G., Reble, B., Reichart, B., Lersch, C., Hammer, C., Haberl, R., Steinbeck, G., Gokel, J.M.: Particular control of infection and rejection episodes after 4 years cardiac transplantation. Texas Heart Inst. J. 13:5-12 (1986)
125. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Pescando, J.M., Ritz, J., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: I_a determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody. J. Exp. Med. 150:1472-1482 (1979)

126. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, C., Schlossman, S.F.: Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 8:4061-4065 (1979)
127. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T-cells. *J. Immunol.* 123, 3:1312-1317 (1979)
128. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: Further characterization of the human inducer T-cell subset defined by monoclonal antibody. *J. Immunol.* 123, 6:2894-2896 (1979)
129. Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Schlossman, S.F.: A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T-cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH₂. *J. Immunol.* 124, 3:1301-1307 (1980)
130. Reinherz, E.L., O'Brian, C., Rosenthal, P., Schlossman, S.: The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 125, 3:1269-1274 (1980)
131. Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: Regulation of the immune response-inducer and suppressor T-lymphocyte subset in human beings. *N. Engl. J. Med.* 303:370-373 (1980)
132. Reitamo, S., Kouttinen, Y.T., Ranki, A., Häyry, P.: The relation of different inflammatory cell types to various parenchymal components of rejecting kidney grafts. *Histopathology* 4:517-523 (1980)

133. Renkonen, R., Soots, A., von Willebrand, E., Häyry, P.: Lymphoid cell subclasses in rejecting renal allograft in the rat. *Cell Immunol.* 77:187-195 (1983)
134. Richardson, W.S., Colin, R.B., Cheeseman, S.H., Tolckoff-Rubin, N.E., Herrin, J.T., Cosimi, A.B., Collins, A.B., Hirsch, M.S., McClushey, R.T., Russell, P.S., Rubin, R.H.: Glomerulopathy associated with cytomegalovirus viremia in renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 2, 305:57-63 (1981)
135. Rigby, R.J., Smillie, A., Chenng, K., Robinson, M.F.: Natural killer activity in renal allograft recipients and response to interferon. *Transpl. Proc.* 17, 2:1682-1684 (1985)
136. Rössler, E.: Wertigkeit der Feinnadelaspirationszytologie zur Diagnose pathologischer Vorgänge nach allogener Nierentransplantation. Dissertation, LMU München (1983)
137. Rook, A.M., Smitz, W.J., Burdick, J.F., Manischewitz, J.F., Frederick, W., Siegel, J.P., Williams, G.M., Quinnan, G.V.: Virus-specific cytotoxic lymphocyte responses are predictive for the outcome of cytomegalovirus infection of renal transplant recipients. *Transpl. Proc.* 15, 6:1466-1469 (1984)
138. Rosenthal, J.T., Hakala, T.R., Iwatsuki, S., Shaw, B.W., Starzel, T.E.: Cadaveric renal transplantation under cyclosporine-steroid therapy. *Surg. Gyn. & Obs.* 157:309-315 (1983)
139. Royston, J., Sullivan, J.L., Periman, P.O., Erlini, E.: Cell-mediated immunity to Epstein-Barr Virus transformed lymphoblasteoid cells in acute infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* 293:1159-1163 (1975)

140. Rubin, R.H., Cosimi, A.B., Tolkoff-Rubin, N.E., Russell, P.S., Hirsch, M.S.: Infections disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. *Transplantation* 24:458-464 (1977)
141. Rubin, R.H., Cosimi, A.B., Hirsch, M.S., Herin, J.T.: Effects of ATG on CMV infections in renal transplant recipients. *Transplantation* 31:143-145 (1981)
142. Scheil, A.G.R., Hall, B.M., Tiller, D.J., et al.: Australian trial of cyclosporine in cadaveric donor renal transplantation. *Transpl. Proc.* 15:2485-2489 (1983)
143. Schlossman, S.F., Chess, L., Humphreys, R.E., Strominger, J.L.: Distribution of I_a -like molecules on the surface of normal and leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1288-1292 (1976)
144. Schooley, R.T., Hirsch, M.S., Colvin, R.B., Cosimi, A.B., Tolkoff-Rbin, N.E., McClushey, R.T., Purton, R.C., Russell, P.S., Hernin, J.T., Delmonico, F.L., Giorgi, J.V., Henle, W., Rubin, R.H.: Association of Herpesvirus infections with T-lymphocyte-subset alterations, glomerulopathy and opportunistic infections after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 308, 6:307-313 (1983)
145. Scothorne, R.J., McGregor, J.A.: Cellular changes in lymph nodes and spleen following skin homografting in rabbit. *J. Anat.* 89:282-288 (1955)
146. Shield, C.F., Blackmore, M., Lennon, J.A., Cook, J.L.: Posttransplant immune monitoring with monoclonal antibodies. *Transpl. Proc.* 16, 6:1496-1498 (1984)

147. Sibley, R.K., Ferguson, M.R., Fryd, D., Sutherland, D.E.R., Simmons, R.L., Najarian, J.S.: Morphology of cyclosporin nephrotoxicity and acute rejection in patients immunosuppressed with cyclosporin and prednisolone. *Surgery* 94:225-234 (1983)
148. Spencer, E.S.: Clinical aspects of CMV-infection in kidney-graft recipients. *Scand. J. Infect. Disease* 6:315-325 (1974)
149. Stadler, J., Koller, C., Hammer, C., Weber, B., Land, W., Castro, L.A., Brendel, W.: Monitoring of viral infections after renal transplantation by fine needle aspiration biopsy and monoclonal antibodies. *Transpl. Proc.* 17:168-170 (1985)
150. Stadler, J.: Immunologisches Monitoring nach Nierentransplantation. Differenzierung von mononukleären Zellen mit monoklonalen Antikörpern im peripheren Blut und im Feinnadelaspirat. Dissertation, 1986
151. Starse, Th., Weie, R., Slunzaleuro, J.: The use of CyA and prednisolone in cadaver kidney transplantation. *Surgery, Gynaecology, Obstetrics* 151:17-26 (1980)
152. Stelzer, G.T., McLeish, R.Y., Lorden, R.E., Watson, S.L.: Alterations in T-lymphocyte subpopulations associated with renal allograft rejection. *Transplantation* 37, 3:261-264 (1984)
153. Strom, T.B., Tilney, N.L., Carpenter, C.B., Busch, G.J.: Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 292, 24:1257-1263 (1975)

154. Thomas, Y., Sosman, J., Irigayen, O., Friedman, S.M., Kung, P.C., Goldstein, G., Chess, L.: Functional analysis of human T-cell subset defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 125, 6:2402-2407 (1980)
155. Tieden, A., Abo, T., Balch, C.M.: Suppressor cell function of human granular lymphocytes identified by the HNK-1 (Leu 7) monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130, 3:1171-1175 (1983)
156. Timonen, T., Saksela, E., Ranki, A., Häyry, P.: Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. *Cell. Immuno.* 48:133-148 (1979)
157. Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.: Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and k-cells. *J. Exp. Med.* 153:569-582 (1981)
158. Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.: Analysis by a single cell cytotoxicity assay of natural killer (NK) cell frequencies among human large granular lymphocytes and of the effects of interferon and their activity. *J. Immunol.* 128:2514-2521 (1982)
159. Ting, A., Morris, P.J.: HLA and Organ Transplantation. *Clin. Surg. Inter.* 3: 28-37 (1982)
160. Waltzer, W.C., Bachvaroff, R.J., Arnold, A., Anaise, D., Rapaport, F.T.: Immunological consequence of renal transplantation and immunosuppression. I. Alterations in human natural killer-cell activity. *J. Clin. Immunol.* 5, 2:78-82 (1985)

161. Van Wauwe, J., Gooseres, J., Kung, F., Goldstein, G.:
Suppression of human T-cell mitogenesis and E-rosette
formation by the monoclonal antibody OKT 11
Immunology 44:865-871 (1981)
162. Van Wauwe, J., De Uley, J.R., Gooseres, J.G.: OKT 3: A
monoclonal anti-human T-lymphocyte antibody with
potent mitogenic properties. *J. Immunol.* 124:2708-2713
(1980)
163. Warrell, M.J., Chin, J., Morris, P.J., Tobin, J.O.H.:
The effect of viral infections on renal transplants
and their recipients. *Quart. J. Med.* 49:219-231 (1980)
164. Weber, B., Welte, M., Castro, L., Land, W., Hammer,
C.: Different impact of azathioprine and cyclosporine-
A on kidney grafts suffering from ATN. *Transplant.*
Proc. 16:1471-73 (1984)
165. Weber, B., Welte M., Hammer, C., Stadler, J., Koller,
C., Csapo, C., Land, W., Hillebrand, G., Castro, M.:
Increase of natural killer cells in rejecting kidney
grafts. *Transpl. Proc.* 16:1177-1178 (1984)
166. Weber, B., Welte, M., Stadler, J., Koller, C., Hammer,
C., Land, W., Castro, L., Hillebrand, G., Schleibner,
S., Csapo, C., Brendel, W.: Detection and differentia-
tion of pathologic changes in nonjecting kidney
grafts. *Transpl. Proc.* 17:120-121 (1985)
167. von Willebrand, E.: Fine needle aspiration cytology of
human renal transplants. *Clin. Immunol. and Immuno-*
pathology 17:309-321 (1980)
168. von Willebrand, E.: OKT 4/8 ratio in the blood and in
the graft during episodes of human renal allograft
rejection. *Cell. Immunol.* 77:196-201 (1983)

169. von Willebrand, E., Häyry, P.: Demonstration of cyclosporin in renal transplants by fine needle aspiration biopsy. *Transpl. Proc.* 15:2716-2718 (1983)
170. von Willebrand, E., Häyry, P.: Reproducibility of the fine needle aspiration biopsy. *Transplantation* 38:314-316 (1984)
171. Von Willebrand, E., Soots, A., Häyry, P.: In situ effector mechanism in rat kidney allograft rejection. I. Characterisation of the host cellular infiltrate in rejecting allograft parenchyma. *Cell Immunology* 46:309-326 (1979)
172. Von Willebrand, E., Soots, A., Häyry, P.: In situ effector mechanism in rat kidney rejection. II. Heterogeneity of the effector cells in the inflammatory infiltrate versus that in the spleen of the recipient rat. *Cell. Immunol.* 46:327-336 (1979)
173. Monoclonal antibody to human B-lymphocytes. Produkthinweis d. Firma Oy Medix Ab. PB 819, SF 00101, Helsinki 10

Zu besonderem Dank weiß ich mich verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Brendel, der mich in sein Institut aufnahm und der mich durch seine Begeisterungsfähigkeit stets motiviert hat.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen Ratschläge zur Ausarbeitung der Methodik und zur wissenschaftlichen Erfassung der Thematik.

Herrn Prof. Dr. W. Land für die Erlaubnis, die Untersuchung an Patienten des Transplantationszentrums München durchzuführen, und für die Überlassung der klinischen Daten.

Herrn Dr. Castro und Herrn Dr. Hillebrand stellvertretend für die Mitarbeiter der Nephrologischen Abteilung der I. Medizinischen Klinik für die Durchführung der Feinnadelbiopsien und die kritischen Anregungen.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen des Instituts für chirurgische Forschung, stellvertretend für alle Fräulein C. Csapo, P. Lenz und E. Simon, ohne deren Unterstützung und Anleitung diese Untersuchung unmöglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Am 6.10.1957 wurde ich als erstes Kind des Arztes Dr. Walter Welte und der Ärztin Hannelore Welte, geborene Traßl, in Würzburg geboren.

Von 1964 - 1967 besuchte ich die katholische Grundschule Garthestraße in Köln. Die Gymnasialzeit verbrachte ich von 1967 - 1973 am Neusprachlichen Gymnasium Köln-Nippes. Nach Umzug der Familie nach Nürnberg schloß sich der Besuch des städtischen Marie-Therese-Gymnasiums (Neusprachlicher Zweig) in Erlangen an, wo ich am 25.06.1976 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Vom 1.7.1976 bis 30.9.1977 leistete ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Das Medizinstudium begann ich im September 1978 an der Université Catholique de Louvain in Brüssel/Belgien. Nach bestandenen Halbjahresprüfungen wechselte ich im April 1979 an die Universität Hamburg, wo ich im März 1981 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Nachdem ich im März 1982 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung absolviert hatte, setzte ich das Studium ab Mai 1982 an der Ludwig Maximilians-Universität in München fort. Nach Famulaturen in Innerer Medizin, Chirurgie, Kinderchirurgie und einer Allgemeinarztpraxis bestand ich im März 1985 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Praktischen Jahr arbeitete ich in der 1. Medizinischen Klinik und im Institut für Anästhesiologie der Ludwig Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, sowie in den Chirurgischen Abteilungen des Beth Israel Hospital und des Brigham and Women Hospital der Harvard Medical School in Boston/USA. Nach Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung im März 1986 erhielt ich am 15. Mai 1986 die Approbation als Arzt.

Seit Oktober 1986 bin ich als Assistenzarzt im Institut für Anästhesiologie der Ludwig Maximilians-Universität (Vorstand: Prof. Dr. K. Peter) beschäftigt.

